

AF

**ENZYMATICALLY ACTIVATED POLYMERIC DRUG CONJUGATES****Publication number:** JP2002542304T**Publication date:** 2002-12-10**Inventor:****Applicant:****Classification:**

**- international:** A61K47/48; A61P1/16; A61P5/00; A61P9/00;  
A61P11/00; A61P13/12; A61P17/02; A61P19/00;  
A61P21/00; A61P25/00; A61P29/00; A61P35/00;  
A61P37/00; A61K47/48; A61P1/00; A61P5/00;  
A61P9/00; A61P11/00; A61P13/00; A61P17/00;  
A61P19/00; A61P21/00; A61P25/00; A61P29/00;  
A61P35/00; A61P37/00; (IPC1-7): A61K47/48;  
A61P1/16; A61P5/00; A61P9/00; A61P11/00;  
A61P13/12; A61P17/02; A61P19/00; A61P21/00;  
A61P25/00; A61P29/00; A61P35/00; A61P37/00

**- European:** A61K47/48H4P; A61K47/48R4

**Application number:** JP20000613476T 20000428

**Priority number(s):** US19990131404P 19990428; US19990163090P  
19991102; WO2000US11670 20000428

**Also published as:**

WO0064486 (A3)  
WO0064486 (A2)  
EP1176985 (A3)  
EP1176985 (A2)  
EP1176985 (A0)

more &gt;&gt;

**Report a data error here**

Abstract not available for JP2002542304T

Abstract of corresponding document: **WO0064486**

The present invention relates to a polymeric drug conjugate with one or more biologically active agents conjugated via an enzymatically cleavable linker to either a regular repeating linear unit comprising a water soluble polymer segment and a multifunctional chemical moiety, or a branched polymer comprising two or more water soluble polymer segments each bound to a common multifunctional chemical moiety, as well as to methods of making such conjugates. The present invention is also directed to pharmaceutical compositions comprising such conjugates and to the use of such conjugates to treat pathological conditions.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

**BEST AVAILABLE COPY**

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-542304

(P2002-542304A)

(43) 公表日 平成14年12月10日 (2002. 12. 10)

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	ページ (参考)
A 6 1 K 47/48		A 6 1 K 47/48	4 C 0 7 6
A 6 1 P 1/16		A 6 1 P 1/16	
5/00		5/00	
9/00		9/00	
11/00		11/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 105 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2000-613476(P2000-613476)	(71) 出願人	ベクトレイムド インコーポレイテッド アメリカ合衆国 ニュージャージー州 プ リンストン ビレッジ プールバード 100 スート 200
(86) (22) 出願日	平成12年4月28日 (2000. 4. 28)	(72) 発明者	ベージェンズ ジェイムズ エム. アメリカ合衆国 ニュージャージー州 プ リンストン メイン ストリート 136 スート 101
(85) 翻訳文提出日	平成13年10月29日 (2001. 10. 29)	(72) 発明者	ベリンカ ベンジャミン エイ. アメリカ合衆国 ニュージャージー州 プ リンストン メイン ストリート 136 スート 101
(86) 国際出願番号	PCT/US 00/11670	(74) 代理人	弁理士 清水 初志 (外1名)
(87) 国際公開番号	WO 00/64486		
(87) 国際公開日	平成12年11月2日 (2000. 11. 2)		
(31) 優先権主張番号	60/131, 404		
(32) 優先日	平成11年4月28日 (1999. 4. 28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/163, 090		
(32) 優先日	平成11年11月2日 (1999. 11. 2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 酵素的に活性化された重合薬物接合体

## (57) 【要約】

本発明は、水溶性ポリマーセグメントおよび多官能化学成分を含む規則的に反復する線状ユニット、または共通多官能化学成分に各々結合した2つ以上の水溶性ポリマーセグメントを含む分枝したポリマーのいずれかに、酵素的に切断可能なリンカーを介して接合された1つ又は複数の生物学的に活性な物質をもつ、重合薬物接合体、ならびにこのような接合体の製造法に関する。本発明はさらに、このような接合体を含む薬学的組成物および、病態を治療するためのこのような接合体の使用にも関する。

(19)日本国特許庁 (J P) (12)公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号  
特表2002-542304  
(P2002-542304A)

(43)公表日 平成14年12月10日(2002.12.10)

(51)IntCl <sup>7</sup>		識別記号		P I	
A 61 K 47/48				A 61 K 47/48	
A 61 P 1/16				A 61 P 1/16	
5/00				5/00	
9/00				9/00	
11/00				11/00	
審査請求 未請求		予備審査請求 有		(全 105 頁)	
最終頁に続く				最終頁に続く	
(21)出願番号 特願2000-613476(P2000-613476)		(71)出願人		ベクトレイトムド インコーポレイテッド	
(36) (22)出願日 平成12年4月28日(2000.4.28)				アメリカ合衆国 ニュージャージー州 プ	
(35) 翻訳文提出日 平成13年10月29日(2001.10.29)				リンストン ヒレッジ プールバード	
(38) 国際出願番号 PCT/US00/11670				100 スーート 200	
(37) 国際公開番号 WO00/64486		(72)発明者		ベイシエンス ジェイムズ エム.	
(36) 国際公開日 平成12年11月2日(2000.11.2)				アメリカ合衆国 ニュージャージー州 プ	
(31)優先権主張番号 60/131,404				リンストン メイン ストリート 136	
(32)優先日 平成11年4月28日(1999.4.28)				スーート 101	
(33)優先権主張国 米国 (US)		(72)発明者		ベリンカ ベンジャミン エイ.	
(31)優先権主張番号 60/163,090				アメリカ合衆国 ニュージャージー州 プ	
(32)優先日 平成11年11月2日(1999.11.2)				リンストン メイン ストリート 136	
(33)優先権主張国 米国 (US)		(74)代理人		弁理士 清水 知志 (外1名)	

(54)【発明の名称】 酵素的に活性化された重合薬物接合体

(57)【要約】

本発明は、水溶性ポリマーセグメントおよび多官能化学成分を含む規則的に反復する線状ユニット、または共通多官能化学成分に各々結合した2つ以上の水溶性ポリマーセグメントを含む分枝したポリマーのいずれかに、酵素的に切断可能なリンカーを介して接合された1つ又は複数の生物学的に活性な物質をもつ、重合薬物接合体、ならびにこのような接合体の製造法に関する。本発明はさらに、このような接合体を含む薬学的組成物および、病態を治療するためのこのような接合体の使用にも関する。

【特許請求の範囲】

- 【請求項1】 (i)水溶性ポリマーセグメントおよび多官能化学成分 (multi functional chemical moiety) を含む、規則的に反復する線状ユニット；または (ii)共通多官能化学成分に各々結合した2つ以上の水溶性ポリマーセグメントを含む、分枝したポリマー
- に、酵素的に切断可能なリンカーを介して接合された1つ又は複数の生物学的に活性な物質を含む、重合薬物接合体 (polymeric drug conjugates)。
- 【請求項2】 上記1つ又は複数の生物学的に活性な物質が、上記規則的に反復する線状ユニットの上記多官能化学成分に上記リンカーを介して接合されている、請求項1記載の接合体。
- 【請求項3】 上記1つ又は複数の生物学的に活性な物質が、上記リンカーを介して上記2つ以上の水溶性ポリマーセグメントの少なくとも1つに接合されている、請求項1記載の接合体。
- 【請求項4】 上記リンカーが、細胞内酵素により切断される、請求項1記載の接合体。
- 【請求項5】 上記リンカーが、細胞外酵素により切断される、請求項1記載の接合体。
- 【請求項6】 上記リンカーが、膜結合性 (membrane-bound) 酵素により切断される、請求項1記載の接合体。
- 【請求項7】 上記リンカーが、標的部位で利用可能である酵素により切断される、請求項1記載の接合体。
- 【請求項8】 上記酵素が、上記標的部位において上方制御される、請求項7記載の接合体。
- 【請求項9】 上記標的部位が、罹患した組織または生物学的液体である、請求項7記載の接合体。
- 【請求項10】 上記罹患した組織が、皮膚、骨、軟骨、筋肉、結合組織、神経組織、生殖器官、内分泌組織、リンパ組織、血管系、または内臓組織に存在する、請求項9記載の接合体。
- 【請求項11】 上記生物学的液体が、血液、胸水、腹水、関節液、涙液、胆

汁、または脳脊髄液である、請求項9記載の接合体。

【請求項12】 リンカーが、微生物感染によりもたらされる酵素、皮膚表性酵素、または細胞により分泌された酵素により切断される、請求項1記載の接合体。

【請求項13】 上記リンカーが、癌細胞により分泌された酵素により切断される、請求項1記載の接合体。

【請求項14】 上記リンカーが、癌細胞表面に局在化した酵素により切断される、請求項1記載の接合体。

【請求項15】 上記リンカーが、慢性炎症性疾患に関連した細胞により分泌されたものにより切断される、請求項1記載の接合体。

【請求項16】 上記リンカーが、リウマチ様関節炎に関連した細胞により分泌された酵素により切断される、請求項1記載の接合体。

【請求項17】 上記リンカーが、骨関節炎に関連した細胞により分泌された酵素により切断される、請求項1記載の接合体。

【請求項18】 上記リンカーが、加水分解、還元反応、酸化反応、pHシフト、光分解、またはそれらの組合せによりさらに切断される、請求項1記載の接合体。

【請求項19】 上記リンカーが、非特異的酵素反応によりさらに切断される、請求項1記載の接合体。

【請求項20】 上記多官能化学成分が、N-(2-ヒドロキシセチル)セリン、リシン、トリス(2-アミノエチル)アミン、N-(p-ニトロフェニルアセチル)-p-ニトロフェニルアラニン酸ヒドラジド、3,5-ジヒドロキシフェニル酢酸、3,5-ジアミノ安息香酸、および6-アミノ-4-(2-アミノエチル)ヘキサノン酸から選択された基に由来する、請求項2記載の接合体。

【請求項21】 上記共通多官能化学成分が、ペンタエリスリトール、デンドリマー、または分岐したリシン系統樹を含む、請求項3記載の接合体。

【請求項22】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約400~約25,000であるポリマーを含む、請求項1記載の接合体。

【請求項23】 上記水溶性ポリマーセグメントが、ポリ(エチレングリコー

ル)、ポリ(エチレングリコール)コポリマー、またはそれらの組合せを含む、請求項1記載の接合体。

【請求項24】 上記水溶性ポリマーセグメントが、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)、ポリ(マレイン酸)、ポリ(リシン)など、またはそれらの組合せを含む、請求項1記載の接合体。

【請求項25】 上記リンカーが、アミノ酸、糖、核酸、もしくは他の有機化合物、またはそれらの組合せを含む、請求項1記載の接合体。

【請求項26】 上記リンカーがペプチド配列を含む、請求項1記載の接合体。

【請求項27】 上記リンカーが、セリンプロテアーゼにより切断されるペプチド配列を含む、請求項1記載の接合体。

【請求項28】 上記セリンプロテアーゼが、トロンピン、キモトリプシン、トリプシン、エラスターゼ、カリクレイン、およびサブチリシンからなる群より選択される、請求項27記載の接合体。

【請求項29】 上記トロンピン切断可能(-cleavable) ペプチド配列が、-Gly-Arg-Gly-Asp-、-Gly-Gly-Arg-、-Gly-Arg-Gly-Asp-Asn-Pro-、-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-、-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-、-Gly-Pro-Arg-、-Val-Pro-Arg-、または-Phe-Val-Argを含む、請求項28記載の接合体。

【請求項30】 上記エラスターゼ切断可能ペプチド配列が、-Ala-Ala-Ala-Ala-Pro-Val-、-Ala-Ala-Pro-Leu-、-Ala-Ala-Pro-Phe-、-Ala-Ala-Pro-Ala-、または-Ala-Tyr-Leu-Val-を含む、請求項28記載の接合体。

【請求項31】 上記リンカーが、システインプロテイナーゼにより切断されるペプチド配列を含む、請求項1記載の接合体。

【請求項32】 上記システインプロテイナーゼが、パバイン、アクチニジン、プロメライン、リソソーム性カタプシン、サイトゾル性カルバイン、および寄生虫プロテアーゼからなる群より選択される、請求項31記載の接合体。

【請求項33】 上記寄生虫プロテアーゼが、トリパノソーマ属(Trypanosoma)または住血吸虫(Schistosoma)に由来する、請求項32記載の接合体。

【請求項34】 上記リンカーが、アスパラギン酸プロテイナーゼにより切断されうるペプチド配列を含む、請求項1記載の接合体。

【請求項35】 上記アスパラギン酸プロテイナーゼが、ペプシン、キモシン、リソゾーム性カタペプシンD、プロセッシング酵素、真菌プロテアーゼ、およびウイルスプロテイナーゼからなる群より選択される、請求項34記載の接合体。

【請求項36】 上記プロセッシング酵素がレニンを含む、請求項35記載の接合体。

【請求項37】 上記真菌プロテアーゼが、ペニシロペプシン、リゾプスベプシン、またはエンドチアペプシンを含む、請求項35記載の接合体。

【請求項38】 上記ウイルス性プロテアーゼが、AIDSウイルス由来のプロテアーゼを含む、請求項35記載の接合体。

【請求項39】 上記リンカーが、マトリックスメタプロテイナーゼにより切断されうるペプチド配列を含む、請求項1記載の接合体。

【請求項40】 上記マトリックスメタプロテイナーゼが、コラゲナーゼ、ストロメライシン、およびゼラチナーゼからなる群より選択される、請求項39記載の接合体。

【請求項41】 上記マトリックスメタプロテイナーゼが、-Gly-Pro-Y-Gly-Pro-Z、-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Z、-Gly-Pro-Ile-Gly-Pro-Z、または-Ala-Pro-Gly-Leu-Zを含む、式中、YおよびZはアミノ酸である、請求項39記載の接合体。

【請求項42】 上記マトリックスメタプロテイナーゼが、-Leu-Gly-、またはIle-Glyを含む、請求項39記載の接合体。

【請求項43】 上記コラゲナーゼ切断可能ペプチド配列が、-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-Z、-Pro-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Z、-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Trp、-Pro-Leu-Gly-Cys(Orn)-His、-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala、-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg、または-Pro-Leu-Ala-Tyr-Trp-Ala-Argを含む、式中、Zはアミノ酸である、請求項40記載の接合体。

【請求項44】 上記ストロメライシン切断可能ペプチド配列が、-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Met-Argを含む、請求項40記載の接合体。

【請求項45】 上記ゼラチナーゼ切断可能ペプチド配列が、-Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser-Argを含む、請求項40記載の接合体。

【請求項46】 上記リンカーが、アンギオテンシン変換酵素により切断されうるペプチド配列を含む、請求項1記載の接合体。

【請求項47】 上記アンギオテンシン変換酵素が、-Asp-Lys-Pro、-Gly-Asp-Lys-Pro、または-Gly-Ser-Asp-Lys-Proを含む、請求項46記載の接合体。

【請求項48】 上記リンカーが、前立腺特異的抗原または前立腺特異膜抗原により切断されうるペプチド配列を含む、請求項1記載の接合体。

【請求項49】 上記リンカーが-(Glu)<sub>n</sub>-を含み、かつnが1~10の整数である、請求項48記載の接合体。

【請求項50】 上記生物学的に活性な物質が、鎮痛薬、麻酔薬、抗真菌薬、抗生物質、抗炎症薬、駆虫薬、抗関節炎薬、解毒薬、制吐薬、抗ヒスタミン薬、抗高血圧薬、抗マラリア薬、抗菌薬、抗精神病薬、解熱薬、防腐薬、抗関節炎薬、抗結核薬、鎮咳薬、抗ウイルス薬、心臓作用薬、下剤、化学療法薬、コルチコイド、抗鬱薬、鎮静薬、診断薬、利尿薬、酵素、去痰薬、ホルモン、催眠薬、ミネラル、栄養補助剤、副交感神経作用薬、カリウム補助剤、放射線増感剤、鎮静薬、スルホアミド、刺激薬、交感神経作用薬、精神安定薬、尿路感染防止薬、血管収縮薬、血管拡張薬、ビタミン、キサンチン誘導体など、およびそれらの組合せを含む、請求項1記載の接合体。

【請求項51】 上記化学療法薬が、ナイトロジェンマスタード、エチレンミン、メチルメラミン、ニトロソ尿素、アルキルスルホン酸、トリアジン、紫酸類似体、ピリミジン類似体、プリン類似体、ビンカルカロイド、エビボドフィロトキシン、抗生物質、酵素、生体反応調節剤、ブラチナ錯体、メチルヒドロラジン誘導体、副腎皮質性抑制剤、ソマトスタチン、ソマトスタチン類似体、ホルモン、ホルモンアナログニスト、またはそれらの組合せを含む、請求項50記載の接合体。

【請求項52】 上記化学療法薬が、メトトレキセート、タキソール、アミノプテリン、ドキソルビシン、プレオマイシン、カンブトセシン、エトポシド、エストラムスチン、フレドニムスチン (prednimustine)、メルファラン、ヒドロ

キシ底素、または5-フルオウラシルを含む、請求項51記載の接合体。

【請求項53】 上記生物学的に活性な物質が、ペプチド性 (-based) 薬学的物質を含む、請求項1記載の接合体。

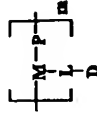
【請求項54】 上記ペプチドベースの薬学的物質が、サイトカイン、増殖因子、細胞受容体アタゴニスト、または細胞受容体アゴニストを含む、請求項53記載の接合体。

【請求項55】 上記生物学的に活性な物質が、エプタフィバチド(eptifibatide)および他の血小板結合タンパク質、顆粒球コロニー刺激因子、ヒト成長因子、血管内皮増殖因子、骨形成タンパク質、インターフェロン、またはインターロイキンを含む、請求項1記載の接合体。

【請求項56】 上記生物学的に活性な物質が、DNA、RNA、DNA断片、RNA断片、またはプラスミドを含む、請求項1記載の接合体。

【請求項57】 下記の構造を含む、請求項2記載の接合体：

【化1】



式中、Pは上記水溶性ポリマーセグメントであり、Mは上記多官能化学成分であり、Lは上記リンカーであり、Dは上記生物学的に活性な物質であり、かつmは整数である。

【請求項58】 mが2と等しいか又はそれよりも大きい整数である、請求項57記載の接合体。

【請求項59】 mが約2から約25の整数である、請求項58記載の接合体。

【請求項60】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約2,000であるポリ(エチレングリコール)を含む、上記多官能化学成分がN-(2-ヒドロアセチル)セリンを含む、上記リンカーが(H-Leu-Gly-Pro-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)を含む、かつ上記生物学的に活性な物質がドキシノルビシン-14-O-ヘミグルタル酸を含む、請求項57記載の接合体。

【請求項61】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約1,000であるポリ(エチレングリコール)を含む、上記多官能化学成分がトリス(2-アミノエチル)アミンを含む、上記リンカーが(H-Val-Pro-Arg-OH)を含む、かつ上記生物学的に活性な物質が、N<sup>ε</sup>-(アミノイミノメチル)-N<sup>ε</sup>-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-L-リシジル-L-α-アスパルチル-L-トリプトフィル-L-プロリル-L-システイナミド、環状(1→6)-ジスルフィドである、請求項57記載の接合体。

【請求項62】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約2,000であるポリ(エチレングリコール)を含む、上記多官能化学成分がN<sup>ε</sup>-(p-アミノフェニルアセチル)-p-アミノフェニルアラニルヒドラジドを含む、上記リンカーが(OH-C-O-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-OH)を含む、かつ上記生物学的に活性な物質がLeu-Gly-α-5-フルオウラシルの薬学的類似体を含む、請求項57記載の接合体。

【請求項63】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約1,000であるポリ(エチレングリコール)を含む、上記多官能化学成分が3,5-ジヒドロキシフェニル酢酸を含む、上記リンカーが(H-Cys(S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)-Glu-Glu-Glu-OH)を含む、かつ上記生物学的に活性な物質がLeu-Gly-α-5-フルオウラシルの薬学的類似体を含む、請求項57記載の接合体。

【請求項64】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約2,000であるポリ(エチレングリコール)を含む、上記多官能化学成分がリシンを含む、上記リンカーが(H-Gly-Pro-Tyr-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Lys-NH<sub>2</sub>)を含む、かつ上記生物学的に活性な物質がメトトレキセートを含む、請求項57記載の接合体。

【請求項65】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約2,000であるポリ(エチレングリコール)を含む、上記多官能化学成分がリシンを含む、上記リンカーが(H-Gly-Pro-Lys-Pro-Val-Gly-Nva-Trp-Lys-OH)を含む、かつ上記生物学的に活性な物質がメトトレキセートを含む、請求項57記載の接合体。

【請求項66】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約2,000であるポリ(エチレングリコール)を含む、上記多官能化学成分がリシンを含む、上記リンカーが(H-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Lys-NH<sub>2</sub>)を含む、かつ上記生物学的に活性な物質がメトトレキセートを含む、請求項57記載の接合体。

【請求項67】 下記構造を含む、請求項3記載の接合体：

Q(-P-L-D),

式中、Qは上記共通多官能化学成分であり、Pは上記水溶性ポリマーセグメントであり、Lは上記リンカーであり、Dは上記生物学的に活性な物質であり、かつkは2と等しいか又はそれよりも大きい整数である。

【請求項68】 kが約2から約100の整数である、請求項67記載の接合体。

【請求項69】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約4,000であるポリ(エチレングリコール)を含み、上記共通多官能化学成分がペンタエリスリトールまたはペンタエリスリトール類似体を含み、上記リンカーが(H-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Lys( $\epsilon$ -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)-NH<sub>2</sub>))を含み、上記生物学的に活性な物質がメトトレキセートを含み、かつ上記整数が4である、請求項67記載の接合体。

【請求項70】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約4,000であるポリ(エチレングリコール)を含み、上記共通多官能化学成分が8本枝 (8 arm) デンドリマーを含み、上記リンカーが(H-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Lys( $\epsilon$ -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)-NH<sub>2</sub>))を含み、上記生物学的に活性な物質がメトトレキセートを含み、かつ上記整数が8である、請求項67記載の接合体。

【請求項71】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約4,000であるポリ(エチレングリコール)を含み、上記共通多官能化学成分がペンタエリスリトールまたはペンタエリスリトール類似体を含み、上記リンカーが(H-Glu-Glu-Glu-Lys( $\epsilon$ -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)-NH<sub>2</sub>))を含み、上記生物学的に活性な物質がメトトレキセートを含み、かつ上記整数が4である、請求項67記載の接合体。

【請求項72】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約4,000であるポリ(エチレングリコール)を含み、上記共通多官能化学成分が8本枝デンドリマーを含み、上記リンカーが(H-Glu-Glu-Glu-Lys( $\epsilon$ -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)-NH<sub>2</sub>))を含み、上記生物学的に活性な物質がメトトレキセートを含み、かつ上記整数が8である、請求項67記載の接合体。

【請求項73】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約4,000であるポリ(エチレングリコール)を含み、上記共通多官能化学成分がペンタエリスリトールまたはペンタエリスリトール類似体を含み、上記リンカーが(H-Gly-Pro-Lys-Pro-Va1-Gly-Nva-Trp-Lys( $\epsilon$ -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)-NH<sub>2</sub>))を含み、上記生物学的に活性

な物質がメトトレキセートを含み、かつ上記整数が4である、請求項67記載の接合体。

【請求項74】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約4,000であるポリ(エチレングリコール)を含み、上記共通多官能化学成分が8本枝デンドリマーを含み、上記リンカーが(H-Gly-Pro-Lys-Pro-Va1-Gly-Nva-Trp-Lys( $\epsilon$ -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)-NH<sub>2</sub>))を含み、上記生物学的に活性な物質がメトトレキセートを含み、かつ上記整数が8である、請求項67記載の接合体。

【請求項75】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約4,000であるポリ(エチレングリコール)を含み、上記共通多官能化学成分がペンタエリスリトールまたはペンタエリスリトール類似体を含み、上記リンカーが(H-Gly-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Lys( $\epsilon$ -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)-NH<sub>2</sub>))を含み、上記生物学的に活性な物質がメトトレキセートを含み、かつ上記整数が4である、請求項67記載の接合体。

【請求項76】 上記水溶性ポリマーセグメントが、分子量約4,000であるポリ(エチレングリコール)を含み、上記共通多官能化学成分が8本枝デンドリマーを含み、上記リンカーが(H-Gly-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Lys( $\epsilon$ -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)-NH<sub>2</sub>))を含み、上記生物学的に活性な物質がメトトレキセートを含み、かつ上記整数が8である、請求項67記載の接合体。

【請求項77】 請求項1記載の接合体および生理的に許容される担体を含む薬学的組成物。

【請求項78】 上記組成物が、注射、または、経口的、局所的、吸入的、もしくは移植的な投与方法に適している、請求項77記載の薬学的組成物。

【請求項79】 請求項1記載の接合体を有効量投与する段階を含む、病態を緩和する方法。

【請求項80】 上記病態が、腫瘍性疾患、慢性炎症疾患、急性炎症疾患、心疾患、腎疾患、肝疾患、肺疾患、神経疾患、筋骨格疾患、および免疫障害を含む、請求項79記載の方法。

【請求項81】 心臓機能、腎機能、肝機能、肺機能、または神経機能を調節する段階を含む、請求項79記載の方法。

【請求項82】 免疫学的機能を改変する段階を含む、請求項79記載の方法。

- 【請求項83】 ホルモン機能を改変する段階を含む、請求項79記載の方法。  
 【請求項84】 微生物感染症を治療する段階を含む、請求項79記載の方法。  
 【請求項85】 瘰癧組織を調節する段階を含む、請求項79記載の方法。  
 【請求項86】 請求項57記載の接合体を製造する方法であり、以下の段階を含む方法：

- (i) 上記生物学的に活性な物質を上記リンカーに結合させる段階；  
 (ii) 上記リンカーを上記多官能化学成分に結合させる段階；および  
 (iii) 上記多官能化学成分を、少なくとも2つの上記水溶性ポリマーセグメントに結合させる段階。

- 【請求項87】 請求項57記載の接合体を製造する方法であり、以下の段階を含む方法：

- (i) 上記生物学的に活性な物質を上記リンカーに結合させる段階；  
 (ii) 上記多官能化学成分を少なくとも2つの上記水溶性ポリマーセグメントに結合させる段階；および  
 (iii) 上記多官能化学成分を上記リンカーに結合させる段階。

- 【請求項88】 請求項72記載の接合体を製造する方法であり、以下の段階を含む方法：

- (i) 樽薬物を形成するために、上記生物学的に活性な物質を上記リンカーに結合させ、かつ上記リンカーを上記水溶性ポリマーセグメントに結合させる段階；および  
 (ii) 上記水溶性ポリマーセグメントを介して、少なくとも2つの上記樽薬物を上記共通多官能化学成分に結合させる段階。

- 【請求項89】 請求項72記載の接合体を製造する方法であり、以下の段階を含む方法：

- (i) 上記生物学的に活性な物質を上記リンカーに結合させる段階；  
 (ii) 少なくとも2つの上記水溶性ポリマーセグメントを上記共通多官能化学成分に結合させる段階；および  
 (iii) 上記リンカーを上記水溶性ポリマーセグメントに結合させる段階。

# 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

### 1. 発明の分野

本発明は一般に、酵素的に切断可能なリンカーにより、規則的に反復する線状コポリマーまたは分枝したコポリマーに結合された生物学的に活性な物質により構成された、重合薬物接合体に関する。特に、このリンカーは、酵素により切断され、かつ結合によってはさらに、pH、イオン強度、またはレドックス条件の变化により切断され得るような、1つ以上の化学結合を含む。このように、本発明の重合薬物接合体は、コポリマーの改質により最適な酵素の接近およびリンカーの切断を提供するように具体的に設計することができる。発明された重合薬物接合体は、薬物の溶解度、薬物の生体適合性、薬物の滞留時間、薬物の吸収特性、および/または薬物の生体活性を変更するために使用することができる。

## 【0002】

### 2. 発明の背景及び概要

主として水への溶解度、薬物毒性、生体適合性、および患者の服薬遵守(例えば、薬物投与間の時間の延長)の問題点を克服するために、多くの薬学的物質の送達を改善する新規製剤技術が開発されている。薬物送達技術は、毒性を低下することにより化合物の治療範囲を増大し、これにより重要な薬物の適応および臨床用途を広げることができる。多くの場合において、重要な薬学的物質、特に抗癌剤の臨床適応は、全身毒性のために用量限定されることが多い。例えば可能性のある重要な化合物の毒性は、埋植可能な生体用吸収可能なポリマーを用いて活性物質を特定の組織に直接送達することにより、顕著に低下することができる(anger, 1990)。しかし、薬物送達のための埋植可能なポリマー技術には固有の限界があり、例えば、薬物放出は、会合したポリマーの加水分解の崩壊またはポリマーマトリックスからの薬物の単純拡散の機能であり、従ってその放出特性は、治療される疾患の機能ではなく、該疾患に実際には無関係であるという事実が挙げられる。

## 【0003】

同様に、これまでに発表されかつ公知の製剤技術の多くは、多種の薬物または



多くの適応症によるそれらの使用を除外するような限界を有し、かつ一般には部位特異的な送達技術ではない。例えば、徐放型送達のために広く利用された戦略は、薬物の脂質またはポリマーへの捕捉またはカプセル封入であり、これは生体システムに対する該物質の利用可能性を制限する(Allenら、1992; Thierryら、1993; Tabata、1993)。この場合、薬物は、カプセルまたはポリマーマトリックスの外側に拡散しなければならぬか、もしくは、カプセル封入物質が、薬物が周囲の組織により吸収され得る形で放出される前に、溶解、崩壊または吸収されなければならぬかのいずれかである。これらの技術は更に、薬物放出のための加水分解による崩壊にも頼っている。ポリマーまたは脂質のカプセル封入システムは、カプセル封入された物質の部位特異的(標的化された)放出を提供するような固有の特性を有さない。加えて、ポリマーカプセル封入システムは、通常水溶性薬物にのみ適するのに対し、リポソーム製剤は、リポソーム二重層の完全性を破壊することなくこれらの二重層に分配されるような脂溶性薬物に限定される。

#### [0004]

合成ポリマー、天然ポリマー、または半合成ポリマー(化学的に修飾された天然の巨大分子)の形の巨大分子が、様々な薬学的物質のための担体として利用されている(例えば、PachenceおよびKohn、1998を参照のこと)。活性物質をポリマーに共有結合し、体内での薬物の制御型または徐放型の放出が可能であるような接合体を作成するために、様々な化学的スベーパー基が、これまで使用されている。これらのスベーパー基は、制御された薬物放出をもたらしような生分解性結合を提供している。これらのスベーパー基のサイズおよび性質、ならびに上記ポリマーの電荷および構造は、制御型または徐放型の放出特性を伴う薬物の設計における考慮のために重要な特性である。結果的に薬物の放出は、ポリマーと活性物質の間の結合の加水分解による切断に左右されることが多い。しかしこのような方法が徐放型の放出を提供するとしても、これは活性物質を特定組織に固有に標的化することはない。

#### [0005]

重合薬物接合体は一般に、体内における制御された薬物放出または方向づけられた薬物分布(およびこれにより、薬物の治療指数が向上する)のための方法を提

供するが、この重合薬物送達システムの適用の成功は、下記に大きく依存する:

(1)良く定義されたポリマー/薬物接合体を再現性を持って調製する能力;(2)適切な有効荷重量(payload)の提供(例えば、薬物の分子量(MW)とポリマーのMWの比は最大でなければならない);および、(3)薬物をポリマーに結合する連結基の選択。特に天然ポリマーおよび半合成ポリマーに関して、薬物のポリマーへの共有結合は、ポリマー主鎖に沿ったランダム分布となるであろう。従って各々の結合した活性物質間の間隔もランダムであり、かつ一般に制御不能である。

#### [0006]

様々なタンパク質分解酵素が、罹患部位の近傍もしくはその部位の細胞、または微生物もしくは宿主細胞による感染部位の細胞により、より多量に生成されることは周知である。例えば、マトリックスメタプロテイナーゼ(MMP)は、細胞外マトリックス組成物を調整しかつ細胞とECMの間の相互作用を改変する酵素の主要なファミリーである(Massovaら、1998)。MMPの治療および代謝における正常な役割に加えて、この酵素ファミリーはさらに、慢性炎症、関節炎および癌を含む様々な病態の進行への関与が示されている。特にMMPは、腫瘍増殖時に活性があり、かつ転移に必要であることがわかっている(ChambersおよびMatrisian、1997)。

#### [0007]

さらに多くの酵素が、感染部位において病原体により、または感染症の根絶に関与している宿主細胞(例えば白血球など)により生成される。トロニン様アラニンアミノペプチダーゼおよびエラスターゼ様酵素活性は、細菌感染症において一般的であることは分かっており(FinlayおよびCossart、1997)、かつこのような酵素のアミノ酸切断配列は詳細に文書化されている。

#### [0008]

病態に起因した酵素の生成または上方制御に関する知識は、これまで薬物送達の戦略として使用されてきた。例えば、感染部位に存在する特異的酵素により切断されることが公知であるアミノ酸配列は、抗生物質に組合わせることができ、これはその後ポリビニルアルコールヒドロゲル創傷用包帯に組込むことができることが示されている(Suzukiら、1998)。従ってゲンタマイシンのような抗生物質

は、感染創傷の滲出液に選択的に放出することができる。同様に、癌細胞により生成された酵素、例えばセリンプロテアーゼ前立腺特異的抗原は、プロドラッグの活性化に使用することができる (Dermeadeら、1998)。

#### [0009]

より最近になって、文献において多くのポリマー/薬物接合体が報告されている。コベセック (Kopecek) ら(米国特許第5,037,883号および第5,258,453号)は、細胞内酵素により切断されるような連結鎖により薬物に結合された高分子担体の使用を開示している。しかしこの方法は、酵素的切断が生じる前に細胞へ取り込まれるべき高分子担体-連結鎖-薬物の接合体の必要要件により限定される。特にこれらの特許は、細胞内リソソームの加水分解により薬物-担体連結の崩壊が生じるような標的化基を伴うポリマーを開示している。コベセック (Kopecek) の技術はさらに、予め形成されたポリマーへの薬物の化学的連結に頼っている。この方法は、上記ポリマーに結合された薬物の量を制限し(典型的には可能性のある連結部位の50%未満)、かつ得られる接合体は、規則的に反復する薬物ユニットを有さない。

#### [0010]

同様の様式で、他の研究者らは、薬物とポリマーの間の結合の生分解に頼るようなポリマーに結合した活性物質を放出する方法を確定している。例えばソープ (Thorpe) は、加水分解性化学結合を介して連結したポリアニオン性ポリマーおよびステロイドからなる2成分システムを開示している (米国特許第5,474,765号)。ソープ (Thorpe) によると、硫酸化されたポリアニオン性多糖類(例えばヘパリン)を主要ポリマー構築物として使用し、かつポリスチレンスルホネート、硫酸化されたポリドニルアルコール、またはポリエチレンスルホネートのような合成の有機硫酸化されたポリマーの使用が意図されている。ソープ (Thorpe) の発明の組織的化成分は、ヘパリンおよび類似ポリマーの内皮細胞に結合している結合部位である。ソープ (Thorpe) によると、この活性物質は予め形成されたポリマーにランダムに接合されている。さらに、これらのポリマーは、本来水溶性ではなく、これらは薬物の滞留時間の延長を示さない。加えてソープ (Thorpe) のポリマーへ活性物質を連結している生物学的に放出可能な結合は、一般に加水

分解可能であり、かつ疾患特異性ではない。ソープ (Thorpe) は、組織に局在化された高濃度の活性物質につながるような薬物放出条件を開示していない。

#### [0011]

他のグループは、薬物送達のための水溶性ポリマーを生じる、PEGコポリマーを改質することを示している。例えばザリプスキー (Zalipsky) ら(米国特許第5,219,564号および米国特許第5,455,027号)は、規則的間隔で官能性ペンダント基を生じる、PEGおよびアミノ酸リシンの線状の予め形成されたポリマー(末端カルボキシル基はリシンであるような)を開示している。しかしこれらの方法は、規則的間隔でポリマー主鎖に沿って薬物結合を提供する方法は開示していない。同様に、部位指定した薬物送達を提供するであろう酵素により切断可能な連結基の概念も開示されていない。

#### [0012]

ザリプスキー (Zalipsky) らが開示したようなポリマーは、別の執筆者達が、薬物放出法を提供するために使用している。例えばフアン (Huang) ら(Bioconjugate Chem., 9:612-617(1998))は、ジスルフィド連結を用いて、システイン含有ペプチドをPEG-リシンコポリマー(規則的に間を空けたチオール基を提供するように改質されている)に接合している。ポイアーニ (Poiani) ら(Bioconjugate Chem., 5:621-630(1994))；米国特許第5,372,807号、米国特許第5,660,822号、および米国特許第5,720,950号)は、これらの同じPEG-リシンの抗線維症化合物cis-ヒドロキシプロリンとの併用を開示している。ザリプスキー (Zalipsky) のように、フアン (Huang) もポイアーニ (Poiani) も、規則的間隔でポリマーに沿って薬物結合を提供する方法も、これらの執筆者により説明された代謝により切断可能な連結基の概念も開示していない。

#### [0013]

別の技術は、プロドラッグ作成の手段として、ポリマーを活性物質(特にタンパク質性 (-based) 薬学的化合物)に結合する方法を提供している。例えば、グリーンワルド (Greenwald) ら(米国特許第5,840,900号)は、プロドラッグを作成するためのポリエチレングリコール(PEG)の活性物質への共有結合を開示している。しかしグリーンワルド (Greenwald) は、活性物質を再構成するために分子

量が大きいPEG(少なくとも20,000)の加水分解による切断に頼るような化合物を開示している。恐らく小さい有機薬物は、PEGの薬物に対する比が余りにも大きいので適していないであろう。加えて、グリーンワルド (Greenwald) は、患部で切断可能となるような連結基の使用を考慮しておらず、かつ得られる接合体は、規則的なポリマー反復構造ではない。

#### [0014]

多くの他の研究者(例えば、米国特許第4,753,984号、米国特許第5,474,765号、米国特許第5,618,528号、米国特許第5,738,864号、米国特許第5,853,713号)は、活性物質を予め形成されたポリマーに連結する技術を開示しているが、これは単独の活性物質の種類に限定されず、かつ規則的に反復するポリマー構造物を形成する方法を説明していない。

#### [0015]

本発明は既して、規則的に反復する線状コポリマーまたは分枝したコポリマーに、酵素的に切断可能なリンカーにより結合された生物学的に活性な物質で構成された、重合薬物接合体に関する。より詳細には、本発明は、水溶性ポリマーセグメントおよび多官能化学成分を含む規則的に反復する線状ユニット、または各々共通多官能化学成分に結合された2つ以上の水溶性ポリマーセグメントを含む分枝したポリマーのいずれかに、酵素的に切断可能なリンカーにより接合された1つ又は複数の生物学的に活性な物質を含む重合薬物接合体に関する。好ましい態様において、1つ又は複数の生物学的に活性な物質が、リンカーを介して、規則的に反復する線状ユニットの多官能化学成分に接合されている。別の好ましい態様において、1つ又は複数の生物学的に活性な物質が、リンカーを介して、2つ以上の水溶性ポリマーセグメントの少なくとも1つに接合されている。

#### [0016]

特に、上記リンカーは、罹患した組織表面の近傍、中および/または上に高濃度で存在するような、酵素により、かつ場合によっては追加的に、pH、イオン強度、またはレドックス条件によっても切断され得る1つ又は複数の化学結合を含むことができる。より詳細には、このリンカーは更に加水分解、還元反応、酸化反応、pHシフト、光分解、またはそれらの組合せによっても切断され得る。この

リンカーはさらに、非特異的酵素反応によっても切断され得る。好ましい態様において、リンカーは、細胞内または細胞外酵素により切断され得る。更に別の好ましい態様において、リンカーは、膜に結合した酵素により切断され得る。

#### [0017]

別の好ましい態様において、上記リンカーは、標的部位において利用可能な酵素により切断され、ここで該酵素は標的部位においてさらに上方制御されることがある。さらにこの標的部位は、罹患した組織または生物学的液体であることができ、ここで罹患した組織は、皮膚、骨、軟骨、筋肉、結合組織、神経組織、生殖器、内分泌組織、リンパ組織、脈管系、または内臓であり、かつ生物学的液体は、血液、胸水、腹水、関節液、唾液、胆汁、または脳脊髄液であることができる。

#### [0018]

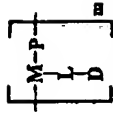
別の好ましい態様において、リンカーは、微生物感染症から生じる酵素、皮膚表在性酵素、または細胞により分泌された酵素、癌細胞により分泌された酵素、癌細胞表面に局在化された酵素、慢性炎症疾患に関連した細胞により分泌された酵素、リウマチ様関節炎に関連した細胞により分泌された酵素、骨関節症に関連した細胞により分泌された酵素により切断され得る。

#### [0019]

本発明の接合体は、線状コポリマーの水溶性ポリマーセグメントおよび/または分枝したコポリマーの多官能化学成分を改質することにより、リンカーに最適な酵素の接近および切断を提供するように設計することができる。本発明の重合薬物接合体は、薬物の溶解度、薬物の生体適合性、薬物の滞留時間、薬物の吸収特性、および/または薬物の生体活性を変更するために使用することができる。この重合薬物接合体の一般構造を、下記に示す。

重合薬物接合体の一般式

#### [化2]



ポリ[D-L-M-P]

規則的に反復する  
線状重合薬物接合体

[化3]



分岐重合薬物接合体

[0020]

本発明の接合体のコポリマー主鎖は、規則的な線状に反復するまたは分枝した骨格のいずれかを形成するように、多官能化学成分に結合した水溶性ポリマーセグメントにより構成される。これらの骨格は、酵素的に切断可能な連結基を通じて生物学的活性基の結合のために、一連の等間隔をあげた化学官能基を提供するように設計される。このコポリマー組成物は、個々のポリマーセグメントおよび/または多官能化学成分のサイズまたは化学的環境の変更により、酵素的に切断可能なリンカーへの最適な酵素的接近が可能であるように修飾することができる。

[0021]

ポリ[D-L-M-P]の一般構造式

ポリマー構築物ポリ[D-L-M-P]<sub>k</sub>は、規則的に反復する線状コポリマー主鎖を形成し、かつ加えて酵素的に切断可能なリンカーLを介して生物学的に活性な物質Dの

ための化学置換基を提供するように、水溶性ポリマーセグメントPを連結するために使用される多官能化学成分M<sub>k</sub>からなる。規則的に反復する線状ポリマーのM-P反復の数は、mで示され、ここでmは、好ましくは2よりも大きいまたはこれと等しい整数であり、より好ましくは約2~約25の整数である。

[0022]

上記水溶性重合薬物接合体は、Dの水への溶解度を増大するように設計することができ、かつ注射、経口的、局所的、吸入送達、皮下付着(埋植)、腹腔鏡検査のような最小の侵襲的外科手技を用いる付着、または他の先に説明された生理的送達法により投与されるように製剤される。

[0023]

このコポリマー/連結している物質の接合体から酵素活性により放出される薬学的物質は、高い局所組織濃度において再構成された薬学活性を提供する。一般に、代謝に感受性がある連結基Lは、標的化された患部においてまたはその近傍に高濃度(非病理部位のレベルよりも高い)で存在する酵素により切断されるように設計されている。

[0024]

一般構造式Q-(P-L-D)<sub>k</sub>

式Q-(P-L-D)<sub>k</sub>の分枝した重合薬物接合体は、酵素により切断可能なリンカーLを介して、生物学的に活性な物質Dに結合された水溶性ポリマーセグメントPをk個結合するために使用される共通多官能化学成分Qからなる。水溶性重合薬物接合体は、Dの水溶解度を増加するように設計することができ、かつ注射、経口的、局所的、吸入送達、皮下付着、最小の侵襲的外科手技(例えば腹腔鏡検査)を用いる付着、または他の先に説明された生理的送達法により投与されるように製剤される。

[0025]

この高分子接合体から酵素活性により放出される薬学的物質は、高い局所組織濃度において再構成された薬学活性を提供する。一般に、代謝に感受性がある連結基Lは、患部においてまたはその近傍に高濃度(非病理部位のレベルよりも高い)で存在する酵素により切断されるように設計されている。

## 【0026】

本発明はさらに、新規接合体および薬学的に許容される担体を含有する薬学的組成物も含み、ここで薬学的組成物は、注射、または経口的、局所的、吸入、もしくは埋植による投与方法に適していることが好ましい。

## 【0027】

本発明は、本発明の新規接合体を有効量投与することを含む病態の緩和法も含み、ここで病態は、新生物形成疾患、慢性炎症疾患、急性炎症疾患、心疾患、腎疾患、肝疾患、肺疾患、神経疾患、筋骨格疾患、および免疫疾患を含むことができる。さらに、この方法は、心臓機能、腎機能、肺機能、または神経機能を調節し；免疫学的機能を改変し；ホルモン機能を改変し；微生物感染症を治療し；もしくは、瘢痕組織を調節することを含むことができる。

## 【0028】

本発明は、水溶性ポリマーに接合された薬学的物質からなる組織-様の化する製剤を形成するための新規組成物を提供する。本発明は、罹患部位において特異的に切断され得るポリマーと薬学的物質の間の化学連結基を用いることにより、薬物放出を標的化する方法を提供する。加えて、本発明の薬学的物質は、水溶性ポリマー主鎖に沿って規則的間隔で間が空けられており、ここで各活性物質間の間隔は、合成法により制御される。

## 【0029】

結果として、本発明の接合体の独特な局面は、薬物および水溶性ポリマー主鎖上に反復するリンカーからなる構築物である。この薬物/リンカー基接合体の結合の間隔は、本明細書に記された合成法により制御することができる。本発明の接合体を形成するひとつの好ましい方法は、薬物、リンカー、およびモノマーが最初に接合体化され、かつ得られた生成物が次に水溶性ポリマーに結合され、これがその後ポリマー接合体を形成するというものである。これは、ポリマー構築物上において高度の薬物-リンカー置換を提供し(典型的には90%より大きい)、ポリマー主鎖に沿って薬物/リンカーの規則的に反復するユニットを提供する。

## 【0030】

本発明はさらに、連結基が、例えば罹患組織の表面の近傍、中および/または上に高濃度で存在する酵素によるような、酵素活性により切断可能であることを必要とする。この独特な局面は、標的部位が指定された薬物送達を得るメカニズムを提供する。

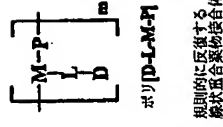
## 【0031】

## 3.発明の詳細な説明

本発明は、酵素的に切断可能なリンカーによって共重合骨格に生物活性物質を共有結合させることによって形成された重合薬物接合体について記述する。生物活性物質が生理的プロセスによって重合骨格から放出され、物質の活性が再構成される、接合体ポリ[D-L-M-P]およびQ(-P-L-D)、を患者に投与する。リンカーは、生理的な切断、好ましくは酵素的切断を受けやすい1つまたはそれ以上の結合を有する化学鎖からなる。本発明の構築物の構造を、全般的重合薬物接合体の式に示す。

全般的な重合薬物接合体の式

## 【化4】



## 【化5】

## Q-(P-L-D)k

分岐重合体

## 【0032】

全般的構築物の式ポリ[D-L-M-P]

本発明の式ポリ[D-L-M-P]の重合構築物は、多官能基化学部分Mからなり、これは有機化合物、アミノ酸、または重合セグメントと共有結合を形成するために用いることができる化学官能基を含むその両者の組み合わせからなり、Pは、連結基であり、Lは、独立してアミノ酸、糖、核酸、または酵素的に切断可能な1つまたはそれ以上の化学結合を有する他の有機化合物からなりうる、またはその組み合わせからなりうる「リンカー」である；Dは、連結基Lと共有結合を形成することができ化学置換基を有する生物活性物質である；Pは、単量体M上の置換基と共有化学結合を形成することができ少なくとも2つの官能基を含む水溶性の重合体または共重合体である；およびMは、重合反復単位の数であり、これは典型的に5～12までの範囲の数であるが、2～25までの範囲に及びうる。

## 【0033】

好ましい態様において、水溶性の重合体セグメントは、分子量約2,000のポリ(エチレングリコール)を含み、多官能基化学部分は、N-(2-ヒドロキシアセチル)セリンを含み、リンカーは、(H-Leu-Gly-Pro-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)を含み、生物活性物質はドキンルジン-14-O-ヘミグルタレートを含む。

## 【0034】

もう一つの好ましい態様において、水溶性重合体セグメントは、分子量約1,000のポリ(エチレングリコール)を含む、多官能基化学部分は、トリス(2-アミノエチル)アミンを含み、リンカーは、(H-Val-Pro-Arg-OH)を含み、生物活性物質は、N<sup>ε</sup>-(アミノイミノメチル)-N<sup>ε</sup>-(3-メルカプト-1-オキソプロピル-L-リ)ジルグリ

シル-L-α-アスパルチル-L-トリプトフィル-L-プロリル-L-システインアミド、環状(1→6)ジスルフィドを含む。

## 【0035】

もう一つの好ましい態様において、水溶性重合体セグメントは、分子量約2,000のポリ(エチレングリコール)を含み、多官能基化学部分は、N<sub>2</sub>-(p-アミノフェニルアセチル)-p-アミノフェニルアラニルヒドrazidを含む、リンカーは、(OCH<sub>2</sub>-CO-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-OH)を含み、生物活性物質は、Leu-Gly-α-5-フルオロウラシルの薬学的類似体を含む。

## 【0036】

もう一つの好ましい態様において、水溶性重合体セグメントは、分子量約1,000のポリ(エチレングリコール)を含み、多官能基化学部分は3,5-ジヒドロキシフェニル酢酸を含み、リンカー部分は、(H-Cys(S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)-Glu-Glu-OH)を含み、および生物活性物質は、Leu-Gly-α-5-フルオロウラシルの薬学的類似体を含む。

## 【0037】

もう一つの好ましい態様において、水溶性重合体セグメントは、分子量約2,000のポリ(エチレングリコール)を含み、多官能基化学部分はリジンを含み、リンカーは(H-Gly-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Lys-NH<sub>2</sub>)を含み、および生物活性物質はメソトレキセートを含む。

## 【0038】

もう一つの好ましい態様において、水溶性重合体セグメントは、分子量約2,000のポリ(エチレングリコール)を含み、多官能基化学部分はリジンを含み、リンカーは、(H-Gly-Pro-Lys-Pro-Val-Gly-Nva-Trp-Lys-OH)を含み、および生物活性物質はメソトレキセートを含む。

## 【0039】

もう一つの好ましい態様において、水溶性重合体セグメントは、分子量約2,000のポリ(エチレングリコール)を含み、多官能基化学部分はリジンを含み、リンカーは、(H-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Lys-NH<sub>2</sub>)を含み、および生物活性物質はメソトレキセートを含む。

## 【0040】

全般的構築物の式 $Q(-P-L-D)_k$ 、

本発明の式 $Q(-P-L-D)_k$ の重合構築物は、水溶性重合体セグメントPのk個を結合するために用いられる共通の多官能基化学部分Q、およびPを生物活性物質Dに結合させる酵素的に切断可能なリンカーLからなり、kは好ましくは1～約100の整数、より好ましくは2～約100の整数である。

## 【0041】

水溶性重合接合体プロドラッグシステムは、Dの水溶性を増加させるようにデザインすることができ、注射、経口、局所、吸入輸送、皮下沈着、腹腔鏡のような侵襲性が最小である外科的技法を用いる沈着、またはこれまでに記述されている他の物理的輸送方法によって投与するように製剤化することができる。

## 【0042】

本発明のもう一つの局面は、重合構築物 $Q(-P-L-D)_k$ によって、それぞれの多官能基化学部分Q上に等しく間隔をあけた多数の薬物-リンカー置換基が可能となる点である。重合セグメントPの構造、化学組成、または大きさは、酵素的に切断可能なリンカーLに対する酵素の簡便なアプローチを可能にするために、そして薬物構築物の生物学的利用性を最適にするために容易に変更することができる。

## 【0043】

代謝活性によって重合体/連結物質接合体から放出された薬剤は、高い組織局所濃度で再構成された薬剤活性を提供するであろう。

## 【0044】

好ましい態様において、水溶性重合体セグメントは、分子量約4,000のポリ(エチレングリコール)を含み、共通の多官能基化学部分は、ペンタエリスリトールまたはペンタエリスリトール類似体を含み、リンカーは $(H-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Lys(-CO-CH_2-CH_2-OH)-NH_2)$ を含み、生物活性物質はメントレキセートを含み、そして上記の整数が4である。

## 【0045】

もう一つの好ましい態様において、水溶性重合体セグメントは、分子量約4,000

のポリ(エチレングリコール)を含み、共通の多官能基化学部分は8アームデンドリマーを含み、リンカーは $(H-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Lys(-CO-CH_2-CH_2-OH)-NH_2)$ を含み、生物活性物質はメントレキセートを含み、そして整数が8である。

## 【0046】

もう一つの好ましい態様において、水溶性重合体セグメントは、分子量4,000のポリ(エチレングリコール)を含み、共通の多官能基化学部分は、ペンタエリスリトールまたはペンタエリスリトール類似体を含み、リンカーは $(H-Glu-Glu-Glu-Lys(-CO-CH_2-CH_2-OH)-NH_2)$ を含み、生物活性物質はメントレキセートを含み、そして整数は4である。

## 【0047】

もう一つの好ましい態様において、水溶性重合体セグメントは、分子量約4,000のポリ(エチレングリコール)を含み、共通の多官能基化学部分は8アームデンドリマーを含み、リンカーは $(H-Glu-Glu-Glu-Lys(-CO-CH_2-CH_2-OH)-NH_2)$ を含み、生物活性物質はメントレキセートを含み、そして整数が8である。

## 【0048】

もう一つの好ましい態様において、水溶性重合体セグメントは、分子量約4,000のポリ(エチレングリコール)を含み、共通の多官能基化学部分は、ペンタエリスリトールまたはペンタエリスリトール類似体を含み、リンカーは $(H-Gly-Pro-Lys-Pro-Val-Gly-Nwa-Trp-Lys(-CO-CH_2-CH_2-OH)-NH_2)$ を含み、生物活性物質はメントレキセートを含み、そして上記の整数が4である。

## 【0049】

もう一つの好ましい態様において、水溶性重合体セグメントは、分子量約4,000のポリ(エチレングリコール)を含み、共通の多官能基化学部分は、8アームデンドリマーを含み、リンカーは $(H-Gly-Pro-Lys-Pro-Val-Gly-Nwa-Trp-Lys(-CO-CH_2-CH_2-OH)-NH_2)$ を含み、生物活性物質はメントレキセートを含み、そして上記の整数が8である。

## 【0050】

もう一つの好ましい態様において、水溶性重合体セグメントは、分子量約4,000のポリ(エチレングリコール)を含み、共通の多官能基化学部分は、ペンタエリ

スリトールまたはペンタエリスリトール類似体を含み、リンカーは(H-Gly-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Lys( $\epsilon$ -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)-NH<sub>2</sub>)を含み、生物活性物質はメントレキセートを含み、そして上記の整数が4である。

#### [0051]

もう一つの好ましい態様において、水溶性重合体セグメントは、分子量約4,000のポリ(エチレングリコール)を含み、共通の多官能基化学部分は、8アームデンドリマーを含み、リンカーは(H-Gly-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Lys( $\epsilon$ -CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH)-NH<sub>2</sub>)を含み、生物活性物質はメントレキセートを含み、そして上記の整数が8である。

#### [0052]

##### 重合薬物接合体の集合

本発明の重合薬物接合体ポリ[D-L-M-P]は、異なる4つの単位を用いて集合することができる；多官能基化学部分、M；酵素的に切断可能なリンカー、L；生物活性物質、D；および水溶性重合体セグメント、P。これらの個々の単位は当初、構築物の他の単位との安定な化学結合を形成するために用いられる1つまたはそれ以上の反応性置換基によって置換される。

#### [0053]

本発明に従って、共重合骨格に組み入れた多官能基化学部分Mの1~100%を生物活性物質リンカー接合体D-Lによって置換してもよい。さらに、水溶性重合体セグメントPを多官能基化学部分Mに結合する化学結合は、カルバメート、チオカルバメート、エーテル、ウレア、チオウレア、カーボネート、チオカーボネート、またはエステル官能基を含んでもよい。

#### [0054]

本発明の構築物Q(-P-L-D)<sub>n</sub>はまた、異なる4つの単位を用いて集合することができる；共通の多官能基化学部分、Q；酵素的に切断可能なリンカー、L；生物活性物質、D；および水溶性重合体セグメント、P。これらの個々の単位は当初、構築物の他の単位との安定な化学結合を形成するために用いられる1つまたはそれ以上の反応性置換基によって置換される。

#### [0055]

本発明に従って、共通の多官能基化学部分Qに組み入れた水溶性重合体セグメントPの1~100%を生物活性物質リンカー接合体D-Lによって置換してもよい。さらに、水溶性重合体セグメントPを共通の多官能基化学部分QまたはリンカーLに結合させる化学結合は、カルバメート、チオカルバメート、エーテル、ウレア、チオウレア、カーボネート、チオカーボネート、またはエステル官能基を含んでもよい。

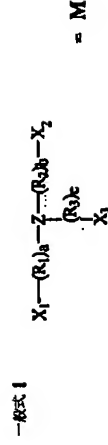
#### [0056]

##### 重合薬物接合体の単位の説明

##### 多官能基化学部分、M

多官能基化学部分Mは、水溶性重合体セグメントPを共有結合するように、そしてリンカーLにも結合するようにデザインされる。これは、一般式1に示す構造および化学官能基を提供するようにデザインおよび合成される。

#### [化6]



式中、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、およびX<sub>3</sub>は、重合体セグメントP、または酵素的に切断可能なリンカーLと共有結合を形成するために用いることができる化学置換基である。X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、およびX<sub>3</sub>は、独立して、ヒドロキシル、アミノ、チオール、アルキルもしくはアリールジスルフィド、インチオシアネート、チオカルボニルイミダゾール、塩化チオカルボニル、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、カルボン酸エステル、スルホン酸、スルホン酸エステル、塩化スルホニル、リン酸、アルキルもしくはアリールスクシニミジルカーボネート、アルキルもしくはアリールクロロカーボネート、アルキルもしくはアリールスクシニミジルチオカーボネート、アルキルもしくはアリールクロロチオカーボネート、ハロゲン化物またはチオエステル官能基（おそらく、さらなる化学反応の前に除去することができる適当な保護基によって置換される）となりうる、またはそれらに由来しうるが、これらに限定されない。R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、またはR<sub>3</sub>は、当初、反応性官能基を隠れさせて、最終的な重



合薬接合体の集合にとって最適な化学および立体環境を提供し、最終的に、本発明の構造物の最適な生物活性を可能にするように重合体セグメントPとリンカーLとを分離させるためのスベーターとして作用する。 $R_1$ 、 $R_2$ 、または $R_3$ は、独立して、炭素原子20個までを含む飽和および不飽和、直鎖および分岐鎖アルキル、アリール、アルキルアリール、ヘテロアルキル、ヘテロアリール、またはヘテロアルキルアリール鎖からなるが、これらに限定しない。 $a=0\sim2$ 、 $b=0\sim2$ 、 $c=0\sim2$ ；および $Z=C$ 、 $CH$ 、 $N$ 、 $P$ 、 $PO$ 、アリールまたはヘテロアリールである。

#### [0057]

好ましい態様において、多官能基化学部分は、 $N-(2\text{-ヒドロキシセチル})$ セリン、リジン、トリス(2-アミノエチル)アミン、 $N-(D\text{-ニトロフェニルアセチル})$ - $\alpha$ -ニトロフェニルアラニン酸ヒドラジド、3,5-ジヒドロキシフェニル酢酸、3,5-ジアミノ安息香酸、または6-アミノ-4-(2-アミノエチル)ヘキサニン酸に由来する。

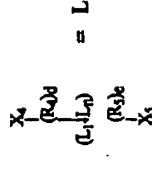
#### [0058]

リンカー、L

酵素的に切断可能なリンカーLを一般式2に記載し、式中、 $X_1$ および $X_2$ は、多官能基化学部分Mおよび生物活性物質Dと共有結合を形成するために用いることができる化学置換基である。 $X_1$ および $X_2$ は、独立して、ヒドロキシル、アミノ、チオール、アルキルもしくはアリールジスルフィド、イソチオシアネート、チオカルボニルイミダゾール、塩化チオカルボニル、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、カルボン酸エステル、スルホン酸、スルホン酸エステル、塩化スルホン酸、リン酸、アルキルもしくはアリールスクシニミジカルカーボネート、アルキルもしくはアリールクロロカーボネート、アルキルもしくはアリールスクシニミジカルカーボネート、ハロゲン化カルボネート、アルキルもしくはアリールクロロチオカーボネート、ハロゲン化物、またはチオエステル官能基（おそらく、さらなる化学反応の前に除去するところができる適当な保護基によって置換される）となりうる、またはそれらに由来しうるが、これらに限定されない。

#### [化7]

一般式 2



$R_1$ 、または $R_2$ は、当初、反応性官能基を離れさせて、最終的な重合薬接合体の集合にとって最適な化学および立体環境を提供し、本発明の構造物の最適な生物活性を可能にするために、最終的にリンカーLを、生物活性物質Dおよび多官能基化学部分Mから分離させるスベーターとして作用する。 $R_1$ 、または $R_2$ は、独立して、炭素原子20個までを含む飽和および不飽和、直鎖および分岐鎖アルキル、アリール、アルキルアリール、ヘテロアルキル、ヘテロアリール、またはヘテロアルキルアリール鎖からなりうるが、これらに限定しない。 $d=0\sim2$ 、 $e=0\sim2$ ；および $(L_1\sim L_n)$ は、独立して、アミノ酸、糖、核酸、または単一もしくは複数の酵素的に切断可能な結合を有する他の有機化合物からなる鎖、またはその組み合わせからなる鎖である。

#### [0059]

好ましい態様において、リンカーは、アミノ酸、糖、核酸、もしくは他の有機化合物、またはその組み合わせを含んでもよい。もう一つの好ましい態様において、リンカーは、ペプチド配列を含んでもよい。

#### [0060]

好ましい態様において、ペプチド配列は、トロンピン、キモトリプシン、トリプシン、エラスターゼ、カリクレイン、またはサブスチリシンのようなセリンプロテアーゼによって切断してもよい。さらに、トロンピンによって切断可能なペプチド配列は、 $-Gly-Arg-Gly-Asp-$ 、 $-Gly-Gly-Arg-$ 、 $-Gly-Arg-Gly-Asp-Asn-Pro-$ 、 $-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-$ 、 $-Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-$ 、 $-Gly-Pro-Arg-$ 、 $-Val-Pro-Arg-$ 、または $-Phe-Val-Arg-$ を含んでもよい。エラスターゼによって切断可能なペプチド配列は、 $-Ala-Ala-Ala-$ 、 $-Ala-Ala-Pro-Val-$ 、 $-Ala-Ala-Pro-Leu-$ 、 $-Ala-Ala-Pro-Phe-$ 、 $-Ala-Ala-Pro-Ala-$ 、または $-Ala-Tyr-Leu-Val-$ を含んでもよい。

## 【0061】

もう一つの好ましい態様において、リンカーは、ババイン、アクチニジン、プロメレイン、ライゾゾームカテプシン、サイトソルカルバイン、および寄生虫プロテアーゼのようなシステインプロテナーゼによって切断してもよい。さらに、寄生虫プロテアーゼは、トリパノソーマ (Trypanosoma) または住血吸虫 (Schistosoma) に由来してもよい。

## 【0062】

もう一つの好ましい態様において、リンカーは、ペプシン、キモシン、ライソゾームカテプシンD、プロセシグ酵素、真菌プロテアーゼ、およびウイルスプロテナーゼのような、アスパラギン酸プロテナーゼによって切断してもよいペプチド配列を含んでもよい。さらに、プロセシグ酵素は、レニンを含んでもよく、真菌プロテアーゼは、ベニシロペプシン、リンバス (rhizopus) ペプシン、またはエンドチアペプシンを含んでもよく、およびウイルスプロテアーゼは、AIDS ウイルスからのプロテアーゼを含んでもよい。

## 【0063】

もう一つの好ましい態様において、リンカーは、コラゲナーゼ、ストロメリシン、およびゼラチナーゼのようなマトリクスメタプロテナーゼによって切断することができるペプチド配列を含んでもよい。さらに、マトリクスメタプロテナーゼは、-Gly-Pro-Y-Gly-Pro-Z、-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Z、-Gly-Pro-Ile-Gly-Pro-Z、または-Ala-Pro-Gly-Leu-Zを含んでもよく、式中、YおよびZはアミノ酸である。好ましくは、マトリクスプロテナーゼは、-Leu-Gly-または-Ile-Gly-Yを含む。さらに、コラゲナーゼ切断可能ペプチド配列は、-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-Z、-Pro-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Z、-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Trp、-Pro-Leu-Gly-Cys(Me)-His、-Pro-Leu-Gly-Leu-Trp-Ala、-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg、または-Pro-Leu-Ala-Tyr-Ala-Argを含んでもよく、式中Zはアミノ酸である；ストロメリシン切断可能ペプチド配列は、-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Met-Argを含んでもよい；およびゼラチナーゼ切断可能ペプチド配列は、-Pro-Leu-Gly-Met-Trp-Ser-Argを含んでもよい。

## 【0064】

もう一つの好ましい態様において、リンカーは、アンジオテンシン転換酵素が-Asp-Lys-Pro、-Gly-Asp-Lys-Pro、または-Gly-Ser-Asp-Lys-Proを含んでもよい、アンジオテンシン転換酵素によって切断することができるペプチド配列を含んでもよい。

## 【0065】

もう一つの好ましい態様において、リンカーは、リンカーが-(Glu)-を含んでもよく、nが1~10までの整数である、前立腺特異抗原または前立腺特異的膜抗原によって切断することができるペプチド配列を含んでもよい。

## 【0066】

生物活性物質、D

生物活性物質Dは、リンカーと共有結合するために、少なくとも1つの化学官能基 (例えば、ヒドロキシル、アミノ、チオール、アルキルもしくはアリールジスルフィド、イソチオシアネート、チオカルボニルイミダゾール、塩化チオカルボニル、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、カルボン酸エステル、スルホン酸、スルホン酸エステル、塩化スルホン酸、リン酸、アルキルもしくはアリールスクシニミジルカルボネート、アルキルもしくはアリールクロロカルボネート、アルキルもしくはアリールフルオロカルボネート、アルキルもしくはアリールクロロチオカルボネート、ハロゲン化物、またはチオエステルの官能基を含む) がこれらに限定しない) を有する、生物学的に有用な物質、類似体、もしくは代謝物、またはいくつかの系の混合物からなる。

## 【0067】

本発明の系によって輸送してもよい生物活性物質には、鎮痛薬、麻酔薬、抗真菌薬、抗生物質、抗炎症薬、駆虫薬、解毒剤、制吐剤、抗ヒスタミン剤、抗高血圧剤、抗マラリア薬、抗微生物剤、抗精神剤、解熱剤、抗敗血症剤、抗関節炎剤、抗結核剤、鎮咳剤、抗ウイルス剤、心作用薬、下剤、化学療法剤、コルチコイド (ステロイド)、抗うつ剤、抑制剤、診断補助剤、利尿剤、酵素、去痰剤、ホルモン剤、催眠剤、無機質、栄養補助剤、副交感神経模倣薬、カリウム補助剤、放射線増感剤、鎮静剤、スルホンアミド、刺激剤、交感神経模倣薬、精神安定剤、抗尿路感染症、血管収縮剤、血管拡張剤、ビタミン、キサンチン誘導体等が含まれる。

まれるがこれらに限定しない。生物活性物質は、小さい有機分子、天然に単離された物質またはその類似体、またはペプチド骨格薬剤となりうる。生物活性薬はまた、DNA、RNA、DNA断片、RNA断片またはプラスミドを含んでもよい。

【0068】

好ましい悪性において、化学療法剤は、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン、メチルメラミン、ニトロソウレア、アルキルスルホネート、トリアゼン、莖醛類似体、ピリミジン類似体、プリン類似体、ビンカアルカロイド、エビポドフィロトキシシン、抗生物質、酵素、生体反応修飾物質、プラチナ複合体、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、ソマトスタチン、ソマトスタチン類似体、ホルモン、ホルモン拮抗剤、またはその組み合わせを含む。好ましくは、化学療法剤はメントレキセート、タキソール、アミノプテリン、ドキシルピシン、ブレオマイシン、カンブドテシン、エトポシド、エストラムスチン、プレドニムスチン、メルファラン、ヒドロキシウレア、または5-フルオロウラシルを含む。

【0069】

もう一つの好ましい状態において、ペプチド骨格薬剤は、サイトカイン、増殖因子、細胞受容体アンチゴニスト、または細胞受容体アンチゴニストを含む。

**[0200]**

もう一つの好ましい態様において、生物活性物質は、エプチファイバチオドおよび他の血小板結合蛋白質、顆粒球コロニー刺激因子、ヒト成長因子、血管内皮増殖因子、骨形成蛋白質、インターフェロン、またはインターロイキンを含む。

【0071】

水溶性重合体セグメント、P

水溶性重合体セグメントPは、多官能基化学部分Mに共有結合するために用いることができる少なくとも2つの化学官能基（例えば、ヒドロキシル、アミノ、チオール、アルキルもしくはアリールジスルフイド、イソチオシアネート、チオカルボニルイミダゾール、塩化チオカルボニル、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、カルボン酸エステル、スルホン酸、スルホン酸エステル、塩化スルホン、リン酸、アルキルもしくはアリールスクシニミジルカーボネート、アルキルもしくはアリールクロロカーボネート、アルキルもしくはアリールスクシニミジルチオ

カーボネート、アルキルもしくはアリールクロロチオカーボネート、ハロゲン化合物またはチオエステル官能基を含むがこれらに限定しない)を含む比較的短い水溶性重合体系(例えば、平均分子量400~25,000)からなる。PIは、ポリ(エチレングリコール)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)、ポリ(マレイン酸)、ポリ(リジン)等または有機官能基におそらく置換されたこれらまたは他の重合体の混合物からなる非重合体となりうるが、これらに限定されない。

【0072】

共通的多官能基化学部分、Q

共通の多官能基化学部分Qは、短い水溶性重合体セグメントのk個にカップリングするようにデザインされている。これは、一般式3に説明する構造および化学官能基を提供するようにデザインおよび合成される。

### 一般式 3

$$I(-X_2)$$

式中、 $X_6$ は、重合体セグメント $P$ と共有結合を形成するために用いることができる化学置換基である。 $X_6$ は、ヒドロキシル、アミノ、チオール、アルキルもしくはアリアルルジスルフィド、イソチオシアネート、チオカルボニルイミダゾール、塩化チオカルボニル、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、カルボン酸エステル、スルホン酸、スルホン酸エステル、塩化スルホニル、リン酸、アルキルもしくはアリアルルスクシニミジルカルボネート、アルキルもしくはアリアルルクロロカーボネート、アルキルもしくはアリアルルスクシニミジルチオカーボネート、アルキルもしくはアリアルルクロロチオカーボネート、ハロゲン化物、またはチオエステル官能基（おそらく、さらなる化学反応の前に除去することができる適当な保護基）によって置換される）となりうる、またはそれらに由来しうるが、これらに限定されない。）は、当初、反応性官能基を離れさせて最終的な重合薬物接合体の集合にとって最適な化学および立体環境を提供し、最終的に、本発明の牌薬物の最適な生物活性を可能にするために、重合体セグメント $P$ とリンカ $L$ とを分離させる。

るスベアーとして作用する。Jは、独立して、炭素原子100個まで、好ましくは20個を含む飽和および不飽和、直鎖および分岐鎖アルキル、アリール、アルキルアリール、ヘテロアルキル、ヘテロアリール、またはヘテロアルキルアリール鎖からなりうるが、これらに限定しない。

## 【0073】

好ましい態様において、共通の多官能基化学部分には、ペンタエリスリトール、デンドリマー、または分岐リジン鎖が含まれる。

## 【0074】

## 重合薬物接合体集合経路

本発明に記載する本発明の重合薬物接合体を集合させるために用いることができるいくつかの合成経路が存在する。

## 【0075】

樟薬物、ポリ[D-L-M-P]

## 集合方法I

反応スキーム1に説明する集合方法は、まず、リンカーLと生物活性薬Dとの共有カップリングを必要とし、接合体D-Lを生成する。次に、D-L樟薬物を多官能基化学部分Mに反応させて、系D-L-Mを生成する。

反応スキーム1



## 【0076】

次に、D-L-Mを適当な水溶性重合体セグメントPに共有カップリングさせて、所望の規則的な反復直鎖状重合薬物接合体であるポリ[D-L-M-P]を生じる。

## 【0077】

## 集合方法II

またはリンカーLを、まずMとカップリングさせてL-Mを生成する（反応スキーム2を参照のこと）。

反応スキーム2

## 【化8】



## 【0078】

この経路の第二の反応は、L-Mの物質Dへの化学カップリングを必要とし、D-L-Mを生成して、次に、適当な重合系Pに結合させて、本発明の樟薬物ポリ[D-L-M-P]を生成する。

## 【0079】

## 集合方法III

または、Mをまず、リンカーLとカップリングさせて（反応スキーム3を参照のこと）、接合体L-Mを調製する。次に、L-MをPと、次にDと反応させて、本発明の樟薬物を調製する。

反応スキーム3

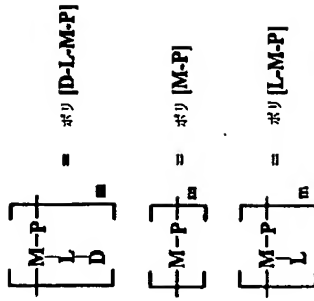


## 【0080】

構造の略語の説明に関しては一般式4を参照のこと。この合成経路において用いる反応条件に応じて、産物樟薬物は、生物活性物質Dによって置換した各リンカーLを有しても有しなくてもよい。

## 【0081】

一般式 4



[0082]

集合方法IV

または、Mを重合体Pに共有結合させて、構築物ポリ[M-P]を生成することができる（反応スキーム4を参照）。次に、共重合接合体をリンカーLに反応させて、ポリ[L-M-P]を生成し、次にこれを生物活性物質Dにカップリングさせて、産物ポリ[D-L-M-P]を生成する。

反応スキーム4



[0083]

この合成経路において用いられる反応条件に応じて、産物構築物は、生物活性物質Dに置換した各リンカーLを有しても有しなくてもよい。

[0084]

集合方法V

または、MをPと反応させて、反応スキーム5に示すように、重合接合体ポリ[M-P]を形成することができる。

反応スキーム5



[0085]

次に、D-Lを個々に合成して、ポリ[M-P]に結合させて、本発明の構築物ポリ[D-L-M-P]を生成することができる。この合成経路において用いられる反応条件に応じて、産物構築物は、D-Lに置換した各多官能基部分Mを有しても有しなくてもよい。

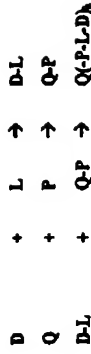
[0086]

構築物、Q(-P-L-D)、

集合方法VI

分岐重合薬物接合体Q(-P-L-D)<sub>n</sub>の集合を反応スキーム6に説明する。リンカーLを生物活性物質Dと最初に共有カップリングさせ、共通の多官能基化学部分Qを2つまたはそれ以上の水溶性重合体セグメントPと結合させた後に、得られた双方の接合体を結合させることによって、本発明の構築物を生成する。

反応スキーム6



[0087]

合成経路において用いられる反応条件に応じて、産物構築物は、D-Lに置換した各重合体セグメントPを有しても有しなくともよい。

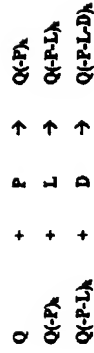
[0088]

集合方法VII

または、Qを、まず2つまたはそれ以上の重合体セグメントPとカップリングさせて、Q(-P)<sub>n</sub>を生成することができる（反応スキーム7を参照）。

[0089]

## 反応スキーム7



## 【0090】

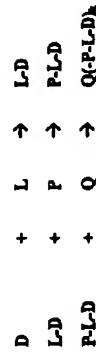
この経路の第二の反応は、 $Q(P)$ とリンカーLとの化学カップリングを必要とし、 $Q(P-L)$ マクロマーを生成して、これを次に適当な生物活性物質Dに結合させて、本発明の構築物 $Q(P-L-D)$ を生成する。この合成経路において用いる反応条件に応じて、産物構築物は、生物活性物質Dによって置換した各リンカーを有しても有しなくともよい。

## 【0091】

## 集合方法XIII

または、生物活性物質Dを、最初にリンカーLにカップリングさせて（反応スキーム8を参照）、接合体L-Dを調製する。次に、L-DをPと反応させて、マクロマーP-L-Dを生成し、次にこれを共通の多官能基部分Qに結合させて、本発明の構築物を調製する。

## 反応スキーム8



## 【0092】

重合薬物接合体、ポリ[D-L-M-P]および $Q[P-L-D]$ の化学的集合方法

本発明の構築物は、構造部分D、L、PおよびMをD、LおよびQと共有カップリングさせることによって集合する。これらの単位は、重合薬物接合体の様々な単位間の安定な共有結合の形成を可能にするように選択される置換基 $X_1 \sim X_4$ によって結合される。

## 【0093】

## 薬学的活性物質DのリンカーLとの結合

多くの薬剤、類似体または代謝物Dは、リンカーLとの共有結合の形成のために反応性置換基を有する、または有するように改変することができる。または、スーパー基をDに結合させて、Lとの結合を可能にすることができる。先に述べたように、これらの置換基は、ヒドロキシル、アミノ、チオール、アルキルもしくはアリールジスルフィド、イソチオシアネート、チオカルボニルイミダゾール、塩化チオカルボニル、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、カルボン酸エステル、スルホン酸、スルホン酸エステル、塩化スルホニル、リン酸、アルキルもしくはアリールスクシニミジルカーボネート、アルキルもしくはアリールクロロカーボネート、アルキルもしくはアリールスクシニミジルチオカーボネート、アルキルもしくはアリールクロロチオカーボネート、ハロゲン化物、またはチオエステル官能基（おそらく、さらなる化学反応の前に除去することができる適当な保護基によって置換される）となりうる、またはそれらに由来しうるが、これらに限定されない。場合によっては、共有結合を開始または増強するために、さらなる試薬をカップリング反応の際に加える。DとLとのカップリングにとって必要な試薬および合成技術は、有機、ペプチド、またはオリゴヌクレオチド合成の当業者に一般的に既知である。官能基 $X_1$ および $X_4$ がいずれもカップリング反応の際にL上に存在する場合、 $X_1$ はDとの反応を防止するために化学的に保護される。

## 【0094】

薬剤および類似体の調製は、特に明記していない限り、平均的な当業者に既知の技術を用いて行われる。

## 【0095】

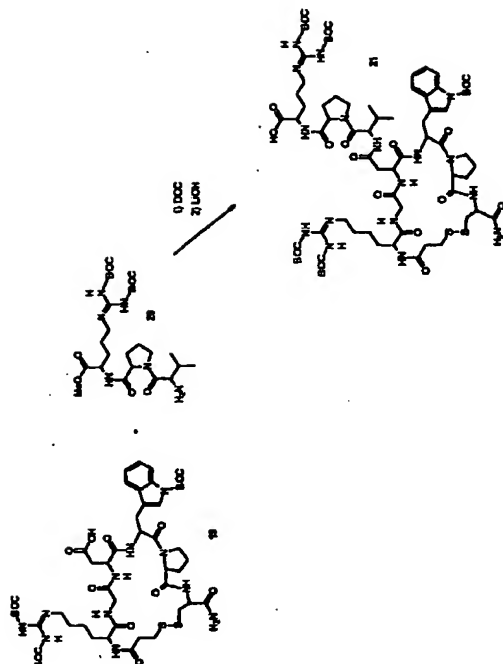
一つの態様において、L上の官能基 $X_1$ は、テトラペプチドFmoc-Cys(Omp)-Glu-Glu-Glu-Osu（化合物40）上のN-ヒドロキシスクシニミジルエステルであり、D上の反応置換基は、抗癌剤類似体H-Leu-Gly( $\alpha$ -5-フルオロウラシル)-OH（化合物3）4) 上のアミノ基である。共有カップリングしたアミド産物D-L（化合物41）を、下記の反応スキーム9に示す。

## 反応スキーム9

## 【化9】

反応スキーム11

[化11]



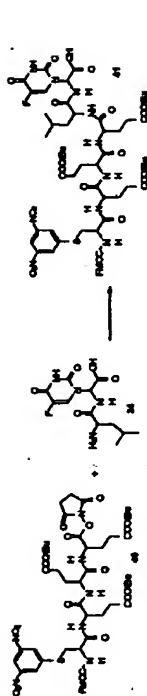
[0098]

もう一つの態様において、L上の官能基 $X_3$ は、ペンタペプチドBoc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Osu (化合物33) のN-ヒドロキシスクシニミジルエステルであり、D上の反応性置換基は抗凝剤類似体H-Leu-Gly( $\alpha$ -5-フルオロウラシル)-OH (化合物34) 上のアミノ基である。共有カップリングしたアミド産物D-L (化合物35) を、

下記の反応スキーム12に示す。

反応スキーム12

[化12]

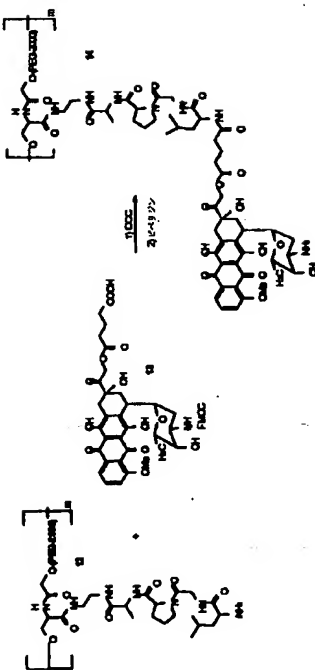


[0096]

もう一つの態様において、 $X_3$ は、テトラペプチドH-Leu-Gly-Pro-Ala-M-P (化合物12) 上のアミノ基であり、D上の反応性置換基は、N-Fmoc-Dキソリルピシン-14-O-ヘミグルタレート (化合物13) のカルボン酸置換基である。活性物質1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミドを反応混合物に加えて、カップリング反応を起こさせる。共有結合したアミン産物、規則的な反復鎖状重合体ポリ[D-L-M-P] (化合物14) を下記の反応スキーム10に示す。

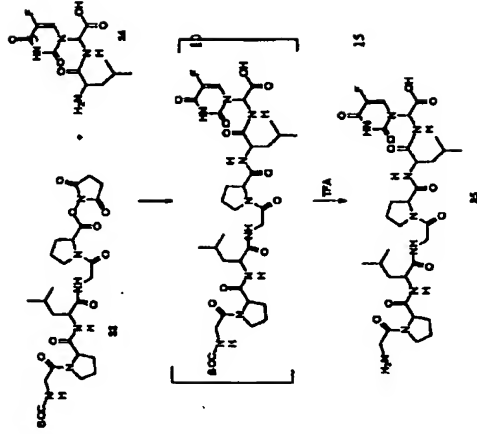
反応スキーム10

[化10]



[0097]

もう一つの態様において、 $X_3$ は、インテグリン類似体 (化合物19) のカルボニル官能基であり、D上の反応性置換基は、トリペプチドH-Val-Pro-Arg(Boc)-OMe (化合物20) 上の末端アミノ基である。活性物質、1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミドを反応混合物に加えて、カップリング反応を起こさせる。共有結合したアミド産物D-L (化合物21) を、下記の反応スキーム11に示す。



## 【0099】

水溶性重合体セグメントPの多官能基化学部分Mへの結合

水溶性重合体セグメントPは、単量体Mとの共有結合のために少なくとも2つの化学官能基を含む短い水溶性重合または共重合系からなる。PへのMのカップリングに必要な試薬および合成技術は、有機、ペプチド、またはオリゴヌクレオチド合成の当業者に一般的に既知である。Pは、ポリエチレングリコール、ポリ(ビニルアルコール)、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、ポリ(アクリル酸)、ポリ(メタクリル酸)、ポリ(マレイン酸)、またはその他の様々な重合体もしくは類似体となりうるが、これらに限定しない。様々な重合および類似体の調製は、重合体合成の分野において平均的な知識を有する当業者に既知である標準的な技術を用いて行われる。共通の多官能基部分Qの重合体セグメントPへの結合は、MとPとの結合の場合と類似の合成反応によって行われる。

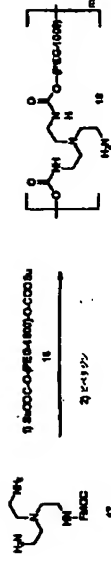
## 【0100】

一つの態様において、M上の $X_L$ および $X_M$ 基は、いずれもアミノ官能基(化合物17)であり、重合体Pは、ポリエチレングリコール-1000のN-ヒドロキシスクニミジルカーボネート置換類似体(化合物16)である。得られたビスカルバマート

接合体である規則的な反復直鎖共重合P-M(化合物18)を、下記の反応スキーム3に示す。

反応スキーム13

【化13】

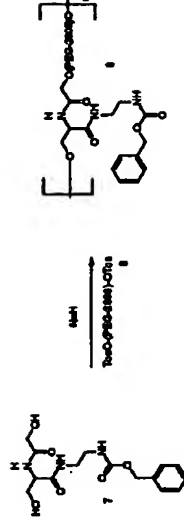


【0101】

もう一つの態様において、 $X_L$ および $X_M$ はいずれもヒドロキシ基(化合物7)であり、P上の反応性官能基(化合物8)は、トルエンホルネートエステルである(下記の反応スキーム14を参照のこと)。塩基性の水素化ナトリウムを反応混合物に加えて、共有カップリングを開始させ、エーテル産物である規則的な反復直鎖状重合体ポリ[M-P](化合物9)を生成する。

反応スキーム14

【化14】



【0102】

リンカーLの多官能基化学部分Mへの結合

リンカーLの多官能基化学部分Mへのカップリングは、L上の官能基 $X_L$ およびM上の $X_M$ を用いて行う。置換基 $X_L$ および $X_M$ は、ヒドロキシ基、アミノ、チオール、アシルキルもしくはアリアルジスルフィド、イソチオシアネート、チオカルボニル、ミダゾール、塩化チオカルボニル、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、カルボン



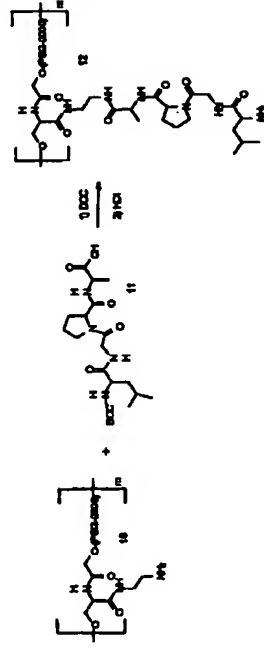
酸エステル、スルホン酸、スルホン酸エステル、塩化スルホニル、リン酸、アルコールもしくはアリールスルホキシニミジルカーボネート、アルキルもしくはアリールクロカーボネート、アルキルもしくはアリールスクシニミジルチオカーボネート、アルキルもしくはアリールクロチオカーボネート、ハロゲン化物、またはチオエステル官能基（おそらく、さらなる化学反応の前に除去することができる適当な保護基によって置換される）となりうる、またはそれらに由来しうるが、これらに限定されない。LとMとのカップリングにとって必要な試薬および合成技術は、有様、ペプチド、またはオリゴヌクレオチド合成の当業者に一般的に既知である。

### [0103]

一つの態様において、 $X_5$ 基は、重合系Pに既に結合しているM上のアミン（化合物10）であり、 $X_6$ は、リンカーL上のカルボン酸（化合物11）であり、これはインサイチューで1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミドによって活性化されて、本発明の構築物のポリ[L-M-P]部分を形成する。得られた産物（化合物12）を、反応スキーム15に示す。

反応スキーム15

### [化15]

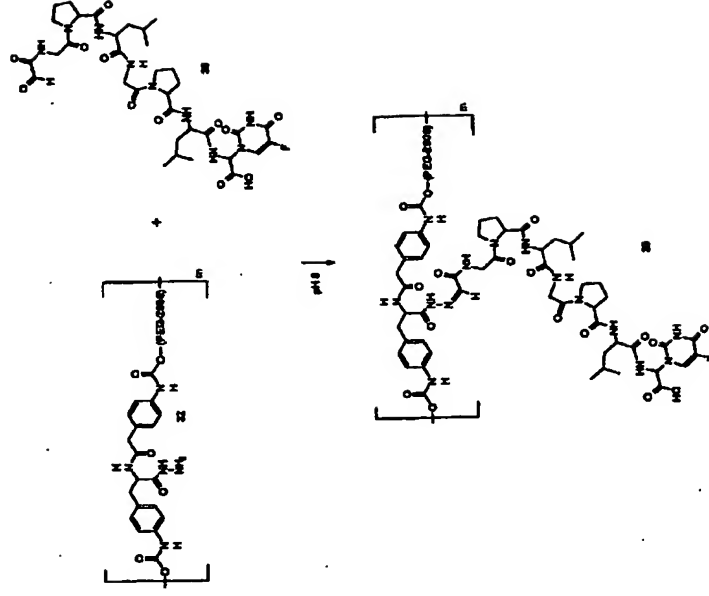


### [0104]

もう一つの態様において、 $X_5$ は、化合物32上の酸ヒドラジドであり、 $X_6$ は、化合物38上のアルデヒドである（反応スキーム16を参照のこと）。

反応スキーム16

### [化16]

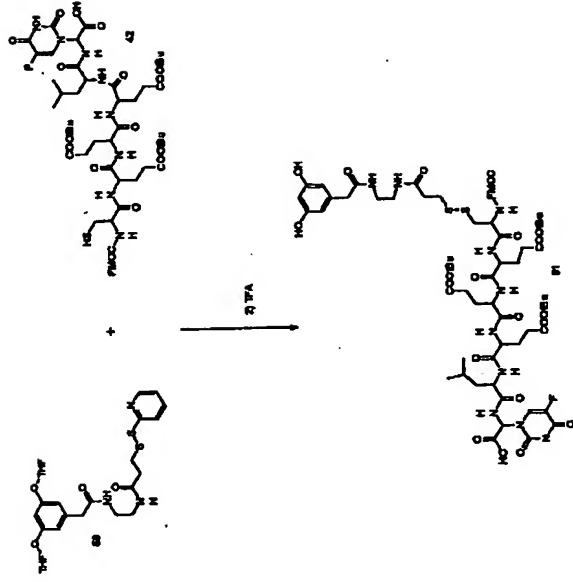


### [0105]

もう一つの態様において、 $X_5$ は、化合物50上のピリジルスルフィドであり、 $X_6$ は、化合物42上のチオール基である（反応スキーム17を参照のこと）。

反応スキーム17

### [化17]



## 【0106】

酵素的に切断可能なリンカーLの調製

リンカーLは、標準的な合成方法論を用いて集合し、個々の生物活性物質Dを本発明の重合薬物接合体の重合足場構造に結合するようにデザインされる。これはまた、その切断によって、生物活性物質またはその類似体が重合構築物から放出される、1つまたはそれ以上の酵素的に切断可能な結合を有するように操作される。リンカーLはまた、1つまたはそれ以上の加水分解、酸化、または光分解によって切断可能な化学結合を含むスベサー基R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>を含んでもよい。Lは、2つの活性官能基R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>を含むため、これらの官能基の1つまたはそれ以上は、構築物の集合の際に化学的に保護して、必要であれば脱保護することができ（化学保護基および脱保護条件の詳細なリストは、グリーン (Greene) ら、[有機合成における保護基 (Protective Groups in Organic Synthesis) ]、ジョン・ウィリー・&サンズ、ニューヨーク州、1981に認められる）。

## 【0107】

リンカーの酵素的に切断可能な結合は、連結基の酵素に対する暴露の増強を可能にするために、または切断のために最適な化学環境を提供するために、スベサー基によって共重合骨格および生物活性物質から離れていてもよい。

## 【0108】

炭素原子20個までを含んでもよい飽和および不飽和、直鎖および分岐鎖アルキル、アリール、またはアルキルアリール、ヘテロアルキル、ヘテロアリール、またはヘテロアルキルアリール基によって結合した、アミノ酸、糖、核酸、または他の有機化合物から、独立して構成される、またはこれらの組み合わせからなるLの集合は、有様、ペプチド、およびオリゴヌクレオチド化学の技術分野の平均的な当業者に既知の試薬および技術によって行うことができる。

## 【0109】

特定の態様において、酵素的に切断可能なリンカーは、標準的なアミノ酸カップリング技術を用いて集合することができるトリペプチドR<sup>1</sup>OC-Cys(DNP)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-OSuに由来する（ロイド・ウィリアムス (Lloyd-Williams) ら、[ペプチドと蛋白質の合成に対する化学的アプローチ (Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins) ]、CRC出版、ニューヨーク州、1997を参照のこと）。

## 【0110】

もう一つの態様において、切断可能なリンカーは、トリペプチドH-Val-Pro-Ar-g(Boc)<sub>3</sub>-OMeに由来する。

## 【0111】

もう一つの態様において、切断可能なリンカーは、テトラペプチドH-Leu-Gly-Pro-Ala-OHに由来する。

## 【0112】

もう一つの態様において、切断可能なリンカーは、ペンタペプチドH-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-OSuに由来する。

## 【0113】

多官能基化学部分Mの調製

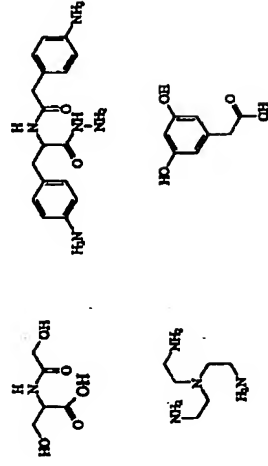
多官能基化学部分Mは、平均的な当業者に既知の試薬および技術を用いて調製される。Mは活性官能基3個、 $X_1$ 、 $X_2$ 、および $X_3$ を含むため、これらの官能基の1つまたはそれ以上を、合成の際に化学的に保護して、必要であれば脱保護することができる。構造物の1つの部分を別の部分に結合させるために用いることができる多くの反応の詳細に関しては、マーチ (March, J.) : 「高等有機化学 (Advanced Organic Chemistry)」、第4版、ジョン・ウィリー・アンドサンズ、ニューヨーク、1992年を参照のこと。有機、ペプチド、およびヌクレオチド部分上の反応性官能基を調製するために用いることができる反応の説明に関しては、ラロック (Larock, R.C.) の「包括的成分変換 (Comprehensive Transformation)」  
、VCH、ニューヨーク州、1989年；ボダンスキー (Bodansky, M.) の「ペプチド合成の原理 (Principles of Peptide Synthesis)」  
、スプリンガー出版、ニューヨーク、1984年、およびミズノ (Mizuno, Y.) の「核酸の有機化学 (The Organic Chemistry of Nucleic Acids)」  
、エルゼビア、ニューヨーク、1986年を参照のこと。

[0114]

4つの多官能基化学部分Mまたはその前駆体の構造を下記の図1に示す。

図1

[化18]



[0115]

共通の多官能基化学部分Qの調製

本発明の分枝重合薬物接合体を調製するために用いられる多官能基化学部分Qは、平均的な当業者に既知の試薬および技術を用いて調製される。Qは、重合セグメント単独と反応するようにデザインされる多数の反応性官能基 $X_4$ を含むため、保護基は通常必要でない。しかし、場合によっては、1つ以上のタイプの生物活性物質Q、酵素の切断リンカーまたは水溶性重合セグメントPが、単一の本発明の重合薬物接合体上で望ましい場合、反応性官能基のいくつかを、特定の合成段階のあいだに保護して、必要に応じて脱保護してもよい。構造物の1つの部分を別の部分に結合させるために用いることができる多くの反応の詳細に関しては、マーチ (March, J.) : 「高等有機化学 (Advanced Organic Chemistry)」  
、第4版、ジョン・ウィリー・アンドサンズ、ニューヨーク州、1992年を参照のこと。有機、ペプチド、およびヌクレオチド部分上の反応性官能基を調製するために用いることができる反応の説明に関しては、ラロック (Larock, R.C.) の「包括的成分変換 (Comprehensive Transformation)」  
、VCH、ニューヨーク州、1989年；ボダンスキー (Bodansky, M.) の「ペプチド合成の原理 (Principles of Peptide Synthesis)」  
、スプリンガー出版、ニューヨーク、1984年、およびミズノ (Mizuno, Y.) の「核酸の有機化学 (The Organic Chemistry of Nucleic Acids)」  
、エルゼビア、ニューヨーク、1986年を参照のこと。

[0116]

2つの多官能基モノマー態様Qの構造を下記の図2に示す。

図2

[化19]



[0117]

薬物放出のメカニズム

生物活性物質Dを、リンカーLに存在する酵素的に切断可能な結合によって、重

合薬物接合体ポリ[D-L-M-P]およびQ[P-L-D]<sub>n</sub>に共有カップリングさせる。いずれかの接合体からのDの放出速度は、インビボでの切断メカニズムに依存するであろう。Dは、生物学的もしくは生理学的プロセス、または化学反応によって構造物から切断することができる。Dは、重合薬物接合体から直接、または複合体D-L'の形のいずれかで(L'の全てまたは一部にカップリングしたDを含む化合物が)放出されるであろう。Dの放出は、酵素的または非酵素的プロセスの双方の組み合わせを含んでもよい。

#### [0118]

活性物質Dの放出に至る切断(単段階または多段階)は、非酵素的プロセスによって行ってもよい。例えば、化学的加水分解(例えば、エステル結合で)は、生物に輸送された際の、接合体ポリ[D-L-M-P]の単純な水和によって開始してもよい。加水分解の切断は、複合体L-Dまたは遊離の活性化合物Dを放出する可能性がある。切断はまた、pHの変化によって開始することができる。例えば、プロドラッグ接合体ポリ[D-L-M-P]を、輸送前に最小の緩衝液または塩基pH溶液に溶解してもよい。プロドラッグ接合体ポリ[D-L-M-P]のLとDまたはMとLの間の結合は、生理的pH 7.4での高度の化学的不安定性を特徴とし、このように、接合体が生物の組織または循環系に輸送された場合に切断され、活性物質Dまたは複合体L-Dを放出するであろう。必要であれば、化学的または酵素的である第二の反応によって、複合体L-DからのDの切断が起こるであろう。N-マンニンヒ塩基結合がこのタイプの活性を示すことは、当技術分野で既知である。

#### [0119]

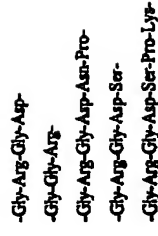
切断はまた、酸化/還元反応によって起こりうる。例えば、ジスルフィド結合を、プロドラッグ接合体ポリ[D-L-M-P]のLとDまたはMとLのあいだに作製することができ。そのようなプロドラッグ接合体は生理的pHにおいて安定であり、プロドラッグ接合体ポリ[D-L-M-P]のLとDまたはMとLのあいだの結合は、グルタチオンの存在下のような還元環境において高度の化学的不安定性を特徴とするであろう。必要であれば、化学または酵素的のいずれかである第二の反応によって、複合体L-DからDの切断が起こるであろう。

#### [0120]

蛋白質分解酵素は、感染物質からの生体シグナル、血液媒介サイトカイン、疾患組織自身、または疾患組織近傍の体液の結果として疾患組織および臓器において、または近傍で産生される。本発明において、連結基Lは、接合体ポリ[D-L-M-P]のLとD、またはMとLの間で切断されるようにデザインされる。そのような蛋白質分解酵素は、処置した生物または微生物感染症の結果として起こりうる。そのような酵素の例には、メタロプロテナーゼおよび他の細胞外マトリクス成分プロテアーゼ(コラゲナーゼ、ストロメリシン、マトリリシン、ゼラチナーゼ、およびエラスターゼを含む)、ライソゾーム酵素(カテプシンを含む)、セリンプロテアーゼ、および凝固カスケードの他の酵素(トロンビンのような)、小胞体酵素(チトクロームP450酵素、加水分解反応酵素、および結合反応酵素のような)、非特異的アミノペプチダーゼおよびエラスターゼ、カルボキシペプチダーゼ、ホスファターゼ、糖分解酵素、ならびに特定の疾患状態の際に存在する他の酵素(アンジオテンシン転換酵素のような)が含まれるがこれらに限定しない。トロンビンのアラニンアミノペプチダーゼおよびエラスターゼ機酵素活性は、細菌感染症において一般的であり、そのような酵素のアミノ酸切断配列は十分に報告されている。

#### [0121]

構造物ポリ[D-L-M-P]およびQ[G-L-D]<sub>n</sub>において、疾患組織において、またはその近傍で連結基Lを切断するために用いることができる可能性があるアミノ酸配列については多くの例が文献に報告されている。例えば、トロンピン(凝固カスケードの際に活性化されるセリンプロテアーゼ)は、以下の配列におけるArg-Gly結合を切断する:



#### [0122]

マトリクスメタロプロテナーゼ(MMPs)および他のマトリクスプロテアーゼは、

、治癒および代謝において多く存在する。しかし、この酵素ファミリーはまた、慢性炎症、関節炎および癌を含む様々な病理プロセスに関係している。特に、MM Psは腫瘍の増殖の際に活性であり、転移にとって必要である。1つの主要な細胞外蛋白質はコラーゲンであり、これは特徴的な反復性のアミノ酸配列：-Gly-Pro-Y-Gly-Pro-Z（式中、YおよびZは、ProおよびHyProを除くいかなるアミノ酸であってもよい）を有する。マトリクスメタプロボロプロテナーゼおよび他の細胞外マトリクスプロテナーゼは、Leu-GlyまたはIle-Gly結合で主に切断する。このファミリーの酵素によって切断されるアミノ酸配列には、以下が含まれるがこれらに限定しない：

-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Z  
-Gly-Pro-Ile-Gly-Pro-Z  
-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-Z  
-Ala-Pro-Gly-Leu-Z  
-Pro-Leu-Gly-(Ser)-Leu-Gly-Z  
-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Tyr  
-Pro-Leu-Gly-Cys(Me)-His  
-Pro-Leu-Gly-Leu-Tyr-Ala-

#### [0123]

このファミリーの酵素によって切断される他の配列には、以下が含まれるがこれらに限定しない：

-Pro-Leu-Ala-Leu-Tyr-Ala-Arg- (ヒト繊維芽細胞コラーゲナーゼ)  
-Pro-Leu-Ala-Tyr-Tyr-Ala-Arg- (ヒト好中球コラーゲナーゼ)  
-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Tyr-Met-Arg- (ヒト繊維芽細胞ストロメリン)  
-Pro-Leu-Gly-Met-Tyr-Ser-Arg- (ヒト繊維芽細胞コラーゲナーゼ  
又は好中球コラーゲナーゼ)  
-Ala-Ala-Ala- (エラスターゼ)  
-Ala-Ala-Pro-Ala- (エラスターゼ)  
-Ala-Ala-Pro-Val- (エラスターゼ)  
-Ala-Ala-Pro-Leu- (エラスターゼ)  
-Ala-Ala-Pro-Phe- (エラスターゼ)  
-Ala-Tyr-Leu-Val- (エラスターゼ)

#### [0124]

疾患のために上方制御され、従って、本発明において用いることができる酵素の一つの例は、アンジオテンシン転換酵素である。この酵素は、以下を含むがこれらに限定しないアミノ酸配列で切断する：

-Asp-Lys-Pro-  
-Gly-Asp-Lys-Pro-  
-Gly-Ser-Asp-Lys-Pro-

#### [0125]

疾患組織の部位での細胞は、生体においてかなり低い濃度で存在する多数の酵素、増殖因子、およびサイトカインを産生するであろう。例えば、分泌型および細胞表面酵素を産生する炎症に関連する細胞には：顆粒球（好中球、好酸球、好塩基球）、単球/マクロファージ、およびリンパ球が含まれる。活性化マクロファージは、エラスターゼ、コラーゲナーゼ、および他のMMPs、プラスミノゲン活性化因子、および他の蛋白質分解酵素を分泌することが知られている。活性化膜マクロファージは、過酸化水素を産生することが知られており、これは本発明のプロドラッグ接合体からDを切断するために用いることができる。炎症部位で活性化された好酸球は、ライソゾーム酵素、ペルオキシダーゼ、ヒスタミナーゼ、および他の酵素を産生する。疾患特異的切断酵素のもう一つの例として、様々な癌細胞（例えば、前立腺癌）は、特異的アミノ酸配列を切断する分泌型または細胞表面酵素を産生する。

#### [0126]

##### 4.実施例

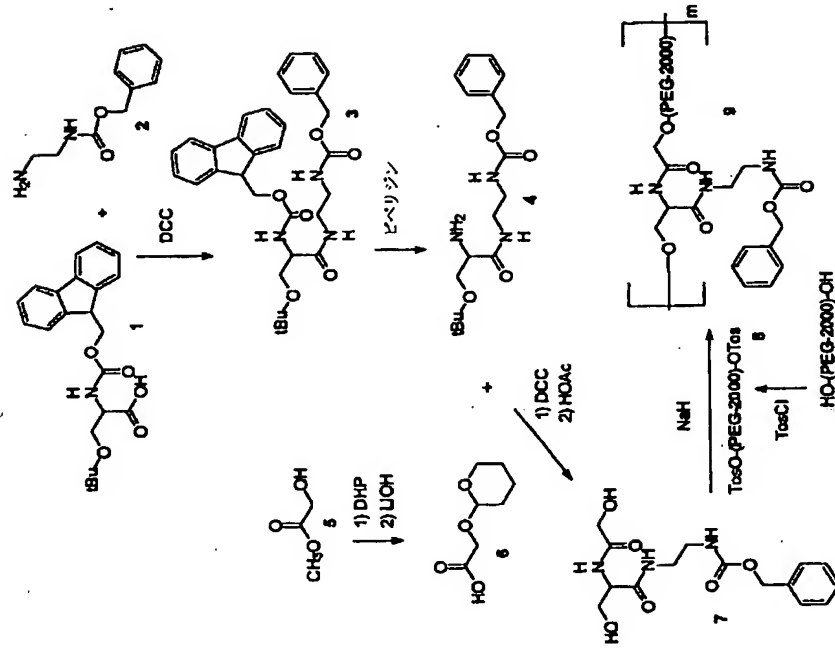
##### 4.1 本発明の薬物結合重合接合体、14の集合

この実施例（合成経路1を参照）は、生物活性物質、D、がFmoc-ドキソニルビシン-14-O-へミグルタレートから誘導され、リンカーの酵素的に切断された領域、(L<sub>1</sub>-L<sub>n</sub>)、がテトラペプチド、Val-Gly-Pro-Ala、であり、多官能性化学部分、M、が化合物7であり、水溶性重合セグメント、P、が平均分子量が約2000(PEG-2000)のポリ（エチレングリコール）である、本発明の規則的反復鎖状重合薬物接

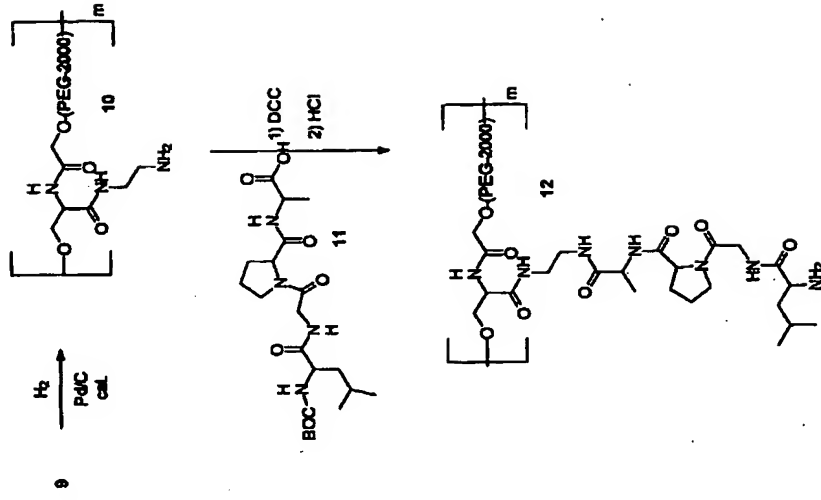
合体の生成法を記載している。

合成経路1

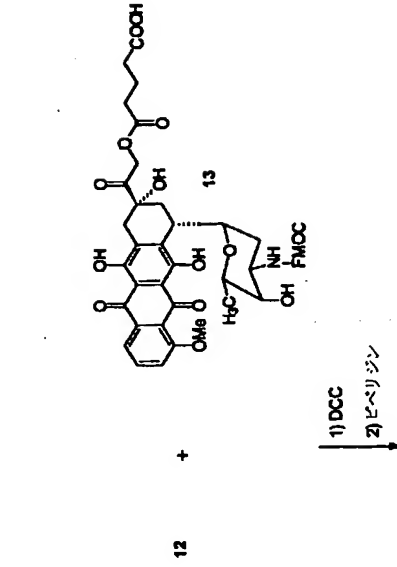
[化20]



[化21]



[化22]



King of Prussia, PA), 1.94g(10mmol)のN-(ベンジルボロニル)-エタン-1,2-ジアミン、2(Denny's, 1984, 1032の方法により生成した)および2.06g(10mmol)の1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(Alldrich, Milwaukee, WI)を添加する。得られた溶液を室温において5時間磁氣的に攪拌し、次いで50 mlの水を加える。反応混合物をろ過し、水層を有機層から分離し、有機層を無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥する。スラリーをろ過し、溶媒を回転式エバポレーターで留去すると粘性のオイルが残る。適当な溶媒を使用して蒸留残渣を結晶化する。と精製生成物、アミド、3が得られる。

**【0128】**

アミン、4の生成

磁気搅拌子、温度計、およびドリエライト(Drierite)充填乾燥用チューブを備えた精溜で乾燥した250mlの丸底フラスコに、5.59g(10mmol)の3, 100mlのN,N-ジメチルホルムアミドおよび1mlのピペリジン(Aldrich)を添加する。反応混合物を室温において磁力的に1.0時間攪拌し、次いで溶媒を回転式エバポレータで留去する。蒸留残渣に250mlの適当な溶媒を加えてまであわせ、得られた沈殿を過し、単離された固形物を減圧下で乾燥してアミン、4を得る。

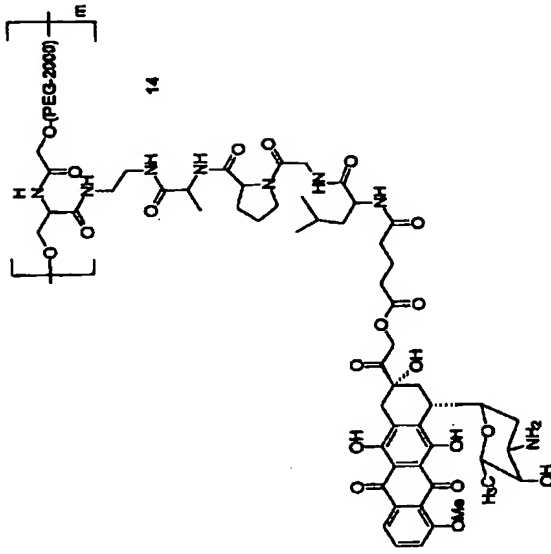
**[0129]**

テトラヒドロピラニルエーテル、6の生成

温度計、磁気攪拌子、およびドリエライト(Oriente)充真乾燥用チューブを備えた250mLの丸底フラスコに100mLのジクロロメタン、0.90gのメチルグリコレート、5、(10mmol, Aldrich)0.84gの3,4-ジヒドロ-2H-ピラン(10mmol, Aldrich)および、0.1gのP-トルエンスルホン酸触媒を添加する。得られた溶液を室温において2時間磁力的に攪拌し、次いで溶媒を回転式エバポレータで留去する。0.44gの水酸化リチウム-水和物(11mmol)を含む75mLのメタノールおよび25mLの水からなる溶液を添加し、得られたスラリーを5℃において15時間攪拌する。反応混合物が中和されるまで、0.1Mの塩酸水溶性を徐々に添加し、かつ100mLのジクロロメタンを添加する。有機層を水層から分離し、有機層を無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥し、ろ過し、溶媒を回転式エバポレータで留去してテトラヒドロピラニルエーテル、6を得る。

アミド、3の生成

磁気撹拌子、温度計、およびドライアイス(Dry Ice)充填乾燥用チューブを備えた清潔で乾燥した500mLの丸底フラスコに、200mLのジクロロメタン、3.83g(10mmol)のN-フルオレニルメトキシカルボニル-O-tert-ブチルセリン、1、(Bachem,



## 【0130】

アミド、7の生成

温度計、ドリエライト(Orierite)充填乾燥用チューブおよび磁気撹拌子を備えた清深で乾燥した500mlの丸底フラスコに、200mlのジクロロメタン、1.60g(10mmol)のテトラヒドロピラニルエーテル、6.3.37g(10mmol)の4、および2.06g(10mmol)の1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(Alldrich)を添加する。反応混合物を室温において磁力的に6時間撹拌し、次いで50mlの水を添加する。スラリーをろ過し、水層を有機層から分離し、有機層を無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥する。得られた混合物をろ過し、溶媒を回転式エバポレータで留去し、酢酸：テトラヒドロフラン：水=4:2:1溶液100mlを添加する。反応混合物を45℃までの温度で3.5時間加熱し、溶媒を回転式エバポレータで留去し、適当な溶媒を使用して蒸留残渣を結晶化し、精製生成物アミド、7を得る。

## 【0131】

ポリ(エチレングリコール)-2000-ジ-4-トルエンスルホネート(DTS-PEG2000)、8の生成

温度計、添加ロート、磁気撹拌子および乾燥 $N_2$ 導入一流出口を備えた清深で乾燥した500mlの丸底フラスコに、3.0g(1.5mmol)のポリ(エチレングリコール)平均分子量2000(Alldrich)、75mlのピリジン、および1.14g(6.0mmol)の塩化トルエンスルホニルを添加する。反応混合物を0℃において12時間磁力的に撹拌し、次いで300mlの水に注ぐ。水溶液を100mlの塩化メチレンで3回抽出し、有機層をあわせて無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥し、ろ過し、溶媒を回転式エバポレータで留去する。適当な溶媒を使用して蒸留残渣を結晶化し、精製重合生成物、8を得る。

## 【0132】

重合接合体、9の生成

温度計、添加ロート、磁気撹拌子および乾燥 $N_2$ 導入一流出口を備えた500mlの丸底フラスコに、60%水素化ナトリウムのミネラルオイル分散液0.86g(2.2mmol)を添加する。分散液を乾燥窒素ブランケット下、分散液を25mlのヘキサンで3回洗浄し、次いで250mlの乾燥テトラヒドロフラン(ナトリウムベンゾフェノンクエタ

ールと共に還流することによって乾燥した)を反応フラスコに添加する。次いで、0.34g(1mmol)のアミド、7を50mlのテトラヒドロフランに加えた溶液を滴加し、次に2.0g(1mmol)のDTS-PEG2000、8、および0.5gの18-クラウン(Crown)-6(Alldrich)を添加する。反応混合物を加熱還流し、室温において8時間撹拌し、次いで、0.1N HClを徐々に添加して反応混合物を酸性化する。溶媒を回転式エバポレータで留去し、蒸留残渣を30mlの水で溶解する。水溶液を蒸留水で透析し(分子量カットオフ値が12,000~14,000のスペクトラポア膜)、得られた溶液を凍結乾燥して重合接合体、9を得る。生成物の平均分子量は、PEG標準品と比較してGPCによって求める。

## 【0133】

重合接合体、10の生成

200mlの水素化フラスコに1.0g(0.5mmol)の接合体、9、100mlの酢酸、および0.1gの5%パラジウム炭素触媒を添加する。反応混合物を振とうし、40psiの水素で室温において16時間水素化する。反応溶液をセライトパッドでろ過し、溶媒を回転式エバポレータで留去して粘性のオイルを得る。蒸留残渣を30mlの水で溶解する。水溶液を蒸留水で透析し(分子量カットオフ値が12,000~14,000のスペクトラポア膜)、得られた溶液を凍結乾燥して重合接合体、10を得る。

## 【0134】

ペプチド置換した重合接合体、12の生成

磁気撹拌子、温度計、ドリエライト(Orierite)充填乾燥用チューブ、および添加ロートを備えた500mlの丸底フラスコに、1.0g(0.5mmol)の重合接合体、10、200mlのジクロロメタン、0.23g(0.5mmol)のBoc-Leu-Gly-Pro-Ala-OH、11、(Bachem)および0.11g(5mmol)の1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(Alldrich)を添加する。反応混合物を室温において4時間磁力的に撹拌し、次いで50mlの水を添加し、有機層を水層から分離し、水層を100mlのジクロロメタンで3回に分けて抽出する。有機層を合わせて、100mlの飽和塩化ナトリウム水溶液で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥し、ろ過し、溶媒を回転式エバポレータで留去する。25mlの3N HClおよび50mlの酢酸エチルを蒸留残渣に添加し、得られるスラリーを室温において0.5時間撹拌する。溶媒を回転式エバポレータで留去し、残渣を2



5mLの水に溶解し、水溶液を蒸留水で透析する（分子量カットオフ値が12,000~14,000のスペクトラポア膜）。溶液を凍結乾燥してペプチド置換重合接合体、12を得る。アミノ酸分析を実施して、10に結合するペプチド、11の量を求める（セリンに対するロイシン、グリシン、プロリンおよびアラニンの比を求めることによる）。

#### [0135]

本発明の薬物結合重合構築物、14の生成

磁気攪拌子、温度計、ドライエライト(Drierite)充填乾燥用チューブ、および添加ロートを備えた500mLの丸底フラスコに0.5g(0.25mmol)の重合接合体、12、200mLのジクロロメタン、0.40g(0.25mmol)のN-Fmoc-Dキソルピシン-ヘミグルタレート(Schallyら, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1996, 93, 7269の方法によって生成した)、および0.06g(0.3mmol)の1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(Aldehyde)を添加する。反応混合物を室温において4時間磁力的に攪拌し、次いで50mLの水を添加し、有機層を水層から分離し、水層を100mLのジクロロメタンで3回に分けて抽出する。有機層を合わせて、100mLの飽和塩化ナトリウム水溶液で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥し、ろ過し、溶媒を回転式エバポレータで留去する。1mLのピペリジンを5mLのN,N-ジメチルホルムアミドに加えたものを蒸留残渣に添加し、得られるスラリーを室温において5分間攪拌する。溶媒を回転式エバポレータで留去し、残渣を25mLの水に溶解し、水溶液を蒸留水で透析する（分子量カットオフ値が12,000~14,000のスペクトラポア膜）。溶液を凍結乾燥して本発明の薬物結合重合構築物、14を得る。14の平均分子量はGPC分析によって求め、生成構築物13の置換の程度はUVおよびNMR分光法を使用して算出する。

#### [0136]

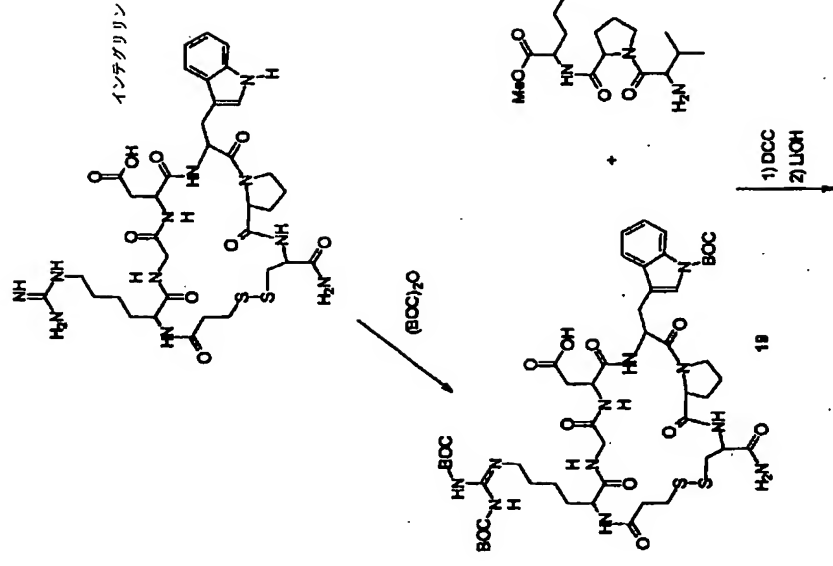
4.2 薬物結合重合接合体、22の集合

この実施例は、物質、D、ガインテグリリン(N<sup>ε</sup>-(アミノイノメチル)-N<sup>ω</sup>-(3-メルカプト-L-オキソプロピル-L-リジルグリシル-L-アスパルチル-L-トリプトフィル-L-プロリル-L-システインアミド、環状(L→6)-ジスルフィド)から誘導され、リンカーの酵素的に切断された領域、(L<sub>1</sub>-L<sub>n</sub>)、がトリペプチド、Val-Pro-Arg

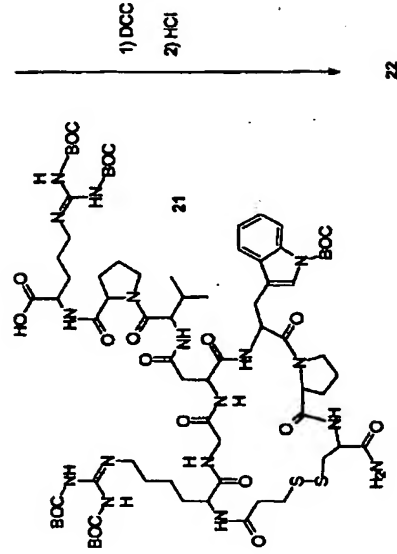
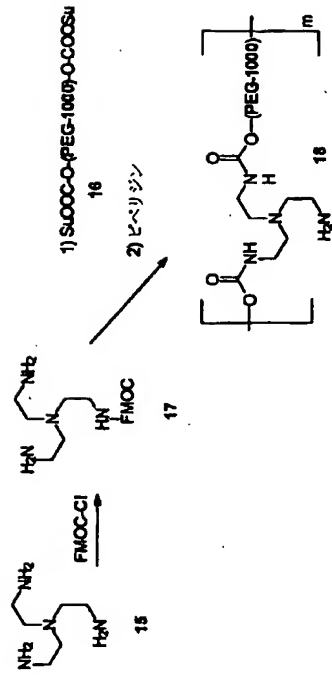
であり、多官能性化学部分、M、が化合物17であり、水溶性重合体セグメント、P、が平均分子量が約1000(PEG1000)のポリ（エチレングリコール）である、規則的に反復する鎖状重合薬物接合体の生成法（合成経路2を参照）を記載している。

合成経路2

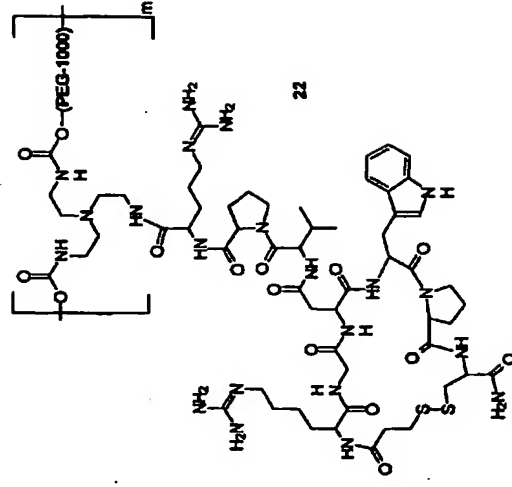
[化23]



[化24]



[化25]



[0137]

N-フルオレニルメトキシカルボニルトリス(2-アミノエチル)アミン、17の生成  
 磁気攪拌子、温度計、ドリエライト(Drierite)充填乾燥用チューブ、および添  
 加ロートを備えた500mLの丸底フラスコに、7.30g(50mmol)のトリス(2-アミノエ  
 チル)アミン、15(Aldrich)および200mLの1,4-ジオキサンを添加する。反応混合  
 物を5℃に冷却し、2.60g(10mmol)の9-フルオレニルメチルクロロカルボネート、  
 Fmoc-Cl(Aldrich)を徐々に添加する。反応混合物を室温において12時間攪拌し、  
 次いで氷水に注ぐ。炭酸ナトリウム水溶液を使用して反応混合物のpHを8に調節  
 し、かつ水層を100mLのジクロロメタンで3回抽出する。有機層を合わせて、飽和  
 塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥し、ろ過し、  
 溶媒を回転式エバポレーターで留去する。適当な溶媒を使用して蒸留残渣を結晶化  
 して、N-フルオレニルメトキシカルボニルトリス(2-アミノメチル)アミン、17  
 を得る。

[0138]

## 重合接合体、18の生成

磁気搅拌子、温度計、ドリエライト(Drierite)充填乾燥用チューブ、および添加ロートを備えた槽で乾燥した500mLの丸底フラスコに、0.37g(1mmol)のN-フルオレニルメトキシカルボニルトリス(2-アミノメチル)アミン、17、5.0mLの0.1Mホウ酸緩衝液、pH9.3、およびポリ(エチレングリコール)平均分子量1000のビス-スクシンイミジルカルボネート、BSC-PEG-1000、16 (Kohjin, Macromolecules, 1992, 25, 4476)の手法を使用して生成した) 1.14g(1mmol)を添加する。反応混合物を15分間搅拌し、溶媒を回転式エバポレーターで留去する。蒸留残渣を2mLのピペリジンと共に室温において15分間搅拌し、溶媒を回転式エバポレーターで留去する。蒸留に25mLの水を混合し、ろ過し、ろ液を蒸留水で透析する(分子量カットオフ値が12,000~14,000のスペクトラポア膜)。水溶液を凍結乾燥して重合接合体、18を得る。PEG標準品に対するGPC分析を使用して、接合体の分子量を求める。

## [0139]

トリ-tert-ブチルオキシカルボニル保護したインテグリン、19の生成

温度計および磁気搅拌子を備えた250mLの丸底フラスコに50mLの1,4-ジオキサン、25mLの水、1mLの1N水酸化ナトリウム、および0.82g(1mmol)のインテグリン(N<sup>6</sup>-(アミノイミノメチル)-N<sup>6</sup>-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-リジル-リシル-4-アスパルチル-4-トリプトフィル-4-プロリル-L-システインアミド、環状(1→6)-ジスルフィド)を添加する。反応混合物を10℃に冷却し、1.44gのジ-tert-ブチルジカルボネート(6.6mmol, Aldrich)を添加する。得られる溶液を室温において1時間搅拌し、溶媒を回転式エバポレーターで留去する。蒸留残渣を水浴で冷却し、50mLの酢酸エチル中で搅拌する。pHが3になるまで、希釈したH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>溶液を徐々に添加し、次いで水層を15mLの酢酸エチルで3回抽出する。有機層を合わせて、50mLの水で2回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥し、ろ過し、溶媒を回転式エバポレーターで留去する。好適な溶媒を使用して蒸留残渣を結晶化し、保護された付加物、19を得る。

## [0140]

ペプチド接合体、21の生成

磁気搅拌子およびドリエライト(Drierite)充填乾燥用チューブを備えた500mLの丸底フラスコに、200mLのジクロロメタン、1.12g(1mmol)のインテグリン類似体、19、0.58g(1mmol, Bachem)のH-Val-Pro-Arg(Boc)2-OMe、20、および0.21g(1mmol)の1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(Aldrich)を添加する。得られる溶液を室温において5時間磁力的に搅拌し、次いで50mLの水を添加する。反応混合物をろ過し、水層を有機層から分離し、有機層を無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥する。得られるスラリーをろ過し、ろ液を回転式エバポレーターで留去してシロップを得る。シロップを3mLメタノール中で1.1mLの1N水酸化リチウム溶液と共に5℃で15時間搅拌し、次いで適当な溶媒で結晶化してペプチド接合体、21を得る。

## [0141]

本発明の薬物結合重合構築物、22の生成

磁気搅拌子、温度計、ドリエライト(Drierite)充填乾燥用チューブおよび添加ロートを備えた500mLの丸底フラスコに、0.5g(0.5mmol)の重合接合体、18、200mLのジクロロメタン、0.84g(0.5mmol)の21および0.10g(0.3mmol)の1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(Aldrich)を添加する。反応混合物を室温において4時間磁的に搅拌し、50mLの水を添加し、有機層を水層から分離し、水層を100mLのジクロロメタンで3回に分けて抽出する。有機層を合わせて、100mLの飽和塩化ナトリウム水溶液で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥し、ろ過し、溶媒を回転式エバポレーターで留去する。25mLの3N HClおよび50mLの酢酸エチルを蒸留残渣に添加し、得られるスラリーを室温において30分間搅拌する。溶媒を回転式エバポレーターで留去し、残渣を25mLの水に溶解し、水溶液を蒸留水で透析する(分子量カットオフ値が12,000~14,000のスペクトラポア膜)。溶液を凍結乾燥して本発明の薬物結合重合構築物、22を得る。22の平均分子量はGPC分析によって求め、カルバメート結合の存在はIR分光法によって確認し、生成構築物の21の置換の程度はUVおよびNMR分光法を使用して算出する。

## [0142]

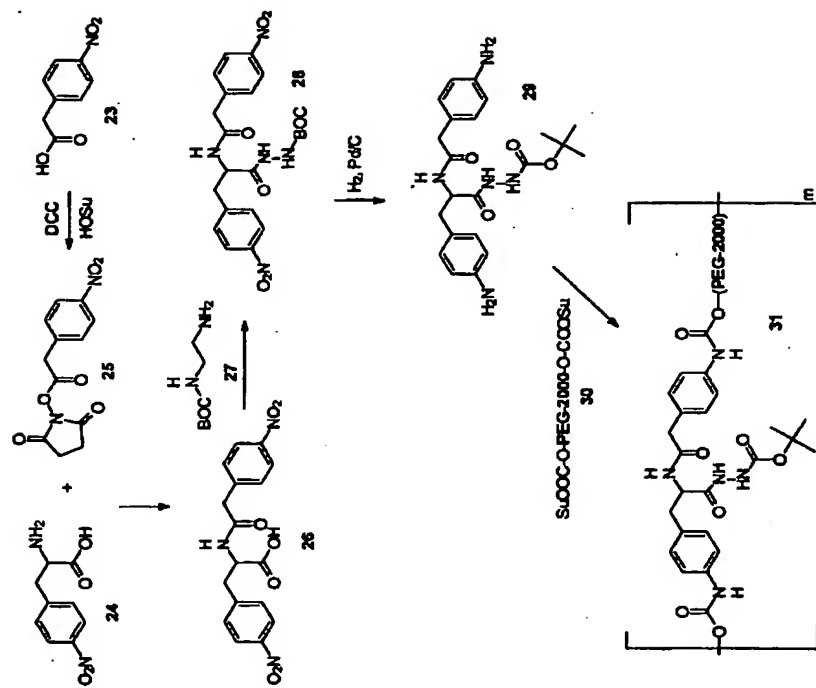
薬物結合重合接合体、39の集合

この実施例は、生物活性物質、D、がH-Leu-Gly-a(5-フルオロウラシル)-OH

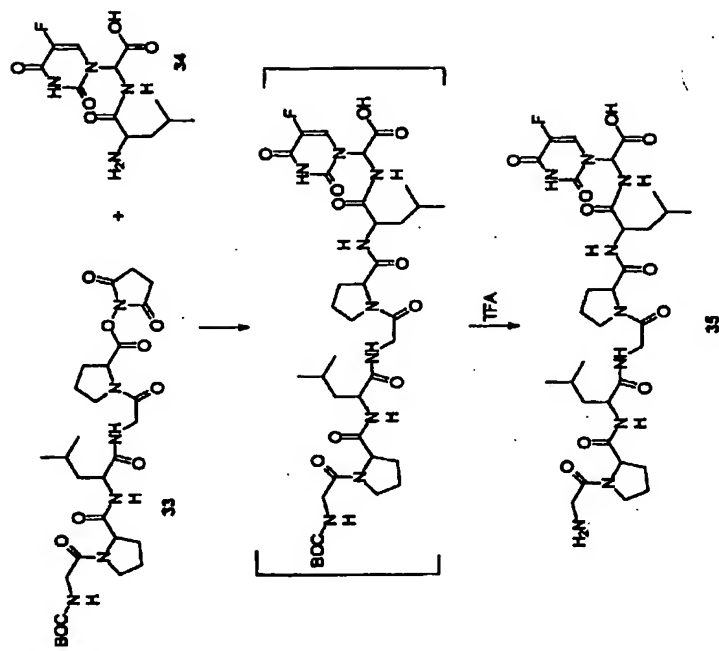
から誘導され、リンカーの酵素的に切断された領域、(L<sub>1</sub>、L<sub>n</sub>)、がヘプタペプチド、Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Leu-Glyであり、多官能性化学部分、M、が化合物29であり、水溶性重合体セグメント、P、が平均分子量が約2000(PEG-2000)のポリ(エチレングリコール)である、本発明の規則的の反復鎖状重合薬物接合体の生成法(合成経路3を参照)を記載している。

合成経路1

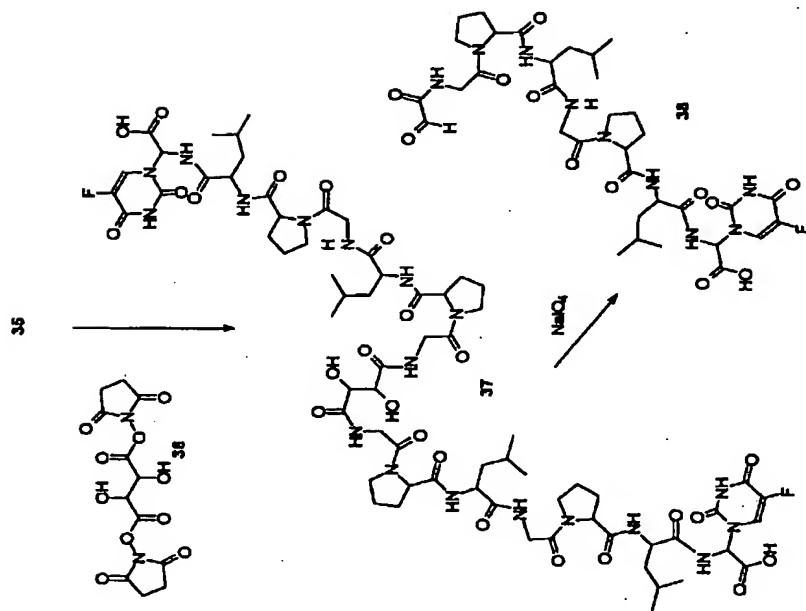
[化26]



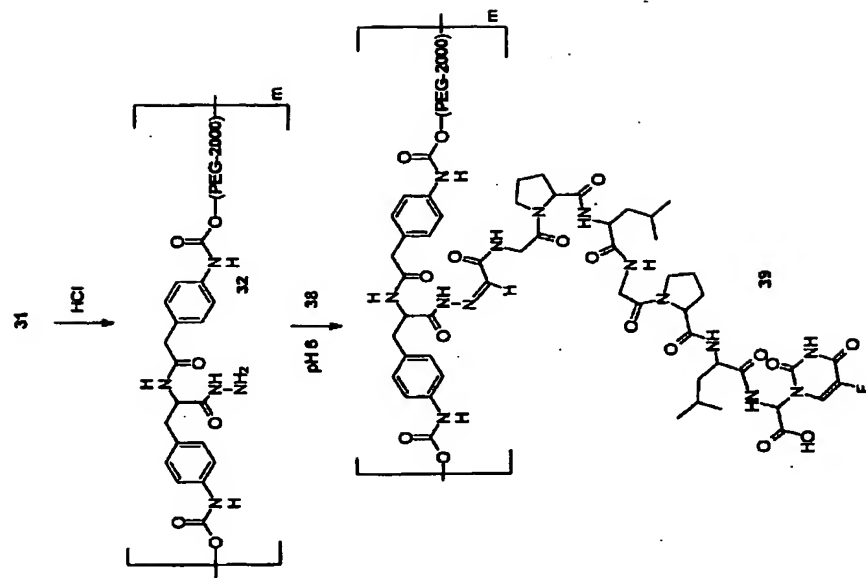
[化27]



[化28]



[化29]



[0143]

p-ニトロフェニル酢酸、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、25の生成

磁気攪拌子、温度計およびドライエライト(Drierite)充填乾燥用チューブを備えた溶液で乾燥した250mLの丸底フラスコに、1.81g(10mmol)のp-ニトロフェニル酢酸(Aldrich)、23、200mLの1,2-ジメトキシエタン、1.15g(10mmol)のN-ヒドロ

キシスクシンイミド (Aldrich)、および2.06g(10mmol)の1,3-ジシクロヘキシカルボジイミド (Aldrich) を添加する。反応混合物を室温において12時間磁力的に攪拌し、ろ過し、溶媒を回転式エバポレータで留去する。適当な溶媒を使用して蒸留残渣を結晶化して、P-ニトロフェニル酢酸、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、25を得る。

#### [0144]

アミド、26の生成

磁気攪拌子、温度計およびドリエライト(Drierite)充填乾燥用チューブを備えた清涼で乾燥した250mLの丸底フラスコに、2.78g(10mmol)のP-ニトロフェニル酢酸、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、25、100mLの乾燥1,2-ジメトキシエタン、1.40mL(10mmol)のトリエチルアミン (Aldrich)、および2.10g(10mmol)のP-ニトロフェニルアミン (Schweizerhall, South Plainfield, NJ)、24を添加する。反応混合物を室温において14時間攪拌し、100mLの水を100mLのジクロロメタンに加えた混合物抽出に注ぐ。反応混合物をろ過し、有機層を水層から分離し、水層を100mLのジクロロメタンで2回回転式エバポレータで留去する抽出する。有機層を合わせて、200mLの飽和塩化ナトリウム水溶液で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥し、ろ過し、溶媒を回転式エバポレータで留去する。適当な溶媒を使用して蒸留残渣を結晶化し、アミド、26を得る。

#### [0145]

Boc保護されたヒドラジド、28の生成

磁気攪拌子およびドリエライト(Drierite)充填乾燥用チューブを備えた500mLの丸底フラスコに、200mLのジクロロメタン、3.73g(10mmol)のアミド、26、1.60g(10mmol)のN-tert-ブチルオルキシカルボニル-1,2-ジアミノエタン (Aldrich)、27、および2.06g(1mmol)の1,3-ジシクロヘキシカルボジイミド (Aldrich, Milwaukee, WI) を添加する。反応混合物を室温において5時間磁力的に攪拌し、次いで50mLの水を添加する。反応混合物をろ過し、水層を有機層から分離し、有機層を無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥する。得られるスラリーをろ過し、溶媒を回転式エバポレータで留去し、適当な溶媒を使用して蒸留残渣を結晶化し、Boc保護されたヒドラジド、28を得る。

#### [0146]

ジアミン、29の生成

200mLの水素化フラスコに4.87g(10mmol)の、100mLのメタノールおよび0.3gの5%Pt-C触媒 (Aldrich) を添加する。得られるスラリーを40psiの水素で機械的に振とうしながら室温において16時間水素化し、次いでセライトパッドでろ過する。溶媒を回転式エバポレータでろ過し、適当な溶媒を使用して蒸留残渣を結晶化し、ジアミン、29を得る。

#### [0147]

5-フルオロウラシル置換したペプチド、35の生成

磁気攪拌子、温度計およびドリエライト(Drierite)充填乾燥用チューブを備えた清涼で乾燥した250mLの丸底フラスコに、6.36g(10mmol)のBoc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Osu、33(Bachem)、3.16g(10mmol)のロイシル2-(5-フルオロウラシル-1-イル)-L,D-グリシン、34(Putnam, Bioconjugate Chem., 1995, 6, 483)の方法によって生成した)、100mLの乾燥1,2-ジメトキシエタンおよび1.40mL(10mmol)のトリエチルアミン (Aldrich) を添加する。反応混合物を室温において5時間磁力的に攪拌を室温において14時間攪拌し、ろ過し、溶媒を回転式エバポレータで留去する。最小量のアセトニトリル水溶液で蒸留残渣を溶解し、次いでC-18逆相HPLC (溶出液：アセトニトリル：水：0.1%トリフルオロ酢酸) を使用して精製する。回収した溶出分画を合わせて、溶媒を回転式エバポレータで留去して、オイルを得、これを最小量の蒸留水に溶解する。水溶液を凍結乾燥して、アミン生成物、35を得る。

#### [0148]

重合接合体、31の生成

磁気攪拌子、温度計、ドリエライト(Drierite)充填乾燥用チューブおよび添加ロートを備えた清涼で乾燥した500mLの丸底フラスコに、4.27g(10mmol)のジアミン、29、5mLのN,N-ジメチルホルムアミド、5.0mLの0.1Mホウ酸緩衝液、pH9.3およびポリ(エチレングリコール) 平均分子量2000のビス-スクシンイミジルカルボネート、BSC-PEG-2000、30(Kohn, Macromolecules, 1992, 25, 4476)の手法を使用して生成した)22.80g(10mmol)を添加する。反応混合物を15時間攪拌し、溶

媒を回転式エバポレータで留去する。蒸留残渣を25mLの水と混合し、ろ過し、蒸留水で透析する（分子量カutoff値が12,000～14,000のスベクトラポア膜）。水溶液を凍結乾燥して重合接合生成物、31を得る。PEG標準品に対するGPCを使用して接合体の分子量を求める。

#### [0149]

ペプチド付加物、37の生成

磁気撹拌子、温度計およびドリエライト(Drierite)充填乾燥用チューブを備えた清深で乾燥した250mLに、3.44g(10mmol)の酒石酸ジスチンイミジル、36(Pierce)、100mLの乾燥1,2-ジメトキシエタン、1.40mL(10mmol)のトリエチルアミン(Aldrich)、および7.37g(10mmol)の35を添加する。反応混合物を室温において14時間磁力的に撹拌し、次いで氷水100mLをジクロロメタン100mLに加えたものに注ぐ。反応混合物をろ過し、有機層を水層から分離し、水層を100mLのジクロロメタンで2回抽出する。有機層を合わせて、200mLの飽和塩化ナトリウム水溶液で1回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥し、溶媒を回転式エバポレータで留去する。適当な溶媒を使用して蒸留残渣を結晶化し、ペプチド付加物、37を得る。

#### [0150]

ペプチドアルデヒド、38の生成

温度計および磁気撹拌子を備えた清深で250mLの丸底フラスコに1.59g(2mmol)のペプチド付加物、37および100mLの0.015Mの過ヨウ素酸ナトリウムを添加する。リン酸ナトリウム緩衝液を使用して反応混合物のpHを7.0に調整し、反応混合物を室温において2時間撹拌する。溶媒を回転式エバポレータで留去し、蒸留残渣を水とアセトニトリルの1:1混合物の最小量に溶解する。得られる溶液を半精製用の(semi-preparative)C18 HPLCカラムに注入し、水：アセトニトリル：0.1% TFA濃度勾配を使用して生成物を溶出する。回収した分画を合わせて、凍結乾燥し、ペプチドアルデヒド、38を得る。

#### [0151]

酸ヒドラジド置換重合接合体、32の生成

清深で250mLの丸底フラスコに1.0gの重合接合体、31、25mLの水および5mLのト

リフルオロ酢酸を添加する。反応混合物を極とうし、溶媒を回転式エバポレータで留去する。蒸留残渣を最小量の水に溶解し、ろ過し、蒸留水で透析する（分子量カutoff値が12,000～14,000のスベクトラポア膜）。水溶液を凍結乾燥して酸ヒドラジド置換した重合接合生成物、32を得る。

#### [0152]

本発明の薬物結合重合接合体、39の生成

温度計および磁気撹拌子を備えた清深で250mLの丸底フラスコに、50mLのリン酸緩衝生理食塩液、pH5.0、1.0g(0.5mmol)の酸ヒドラジド置換した重合接合体、32、および0.40g(0.5mmol)のペプチドアルデヒド、38を添加する。反応混合物を室温において20時間撹拌し、次いで蒸留水で透析する。水溶液を凍結乾燥して本発明の薬物結合重合接合生成物、39を得る。39の平均分子量はGPC分析によって求め、カルバメート結合の存在はIR分光法によって確認し、生成構築物の38の置換の程度は<sup>1</sup>HおよびNMR分光法を使用して算出する。

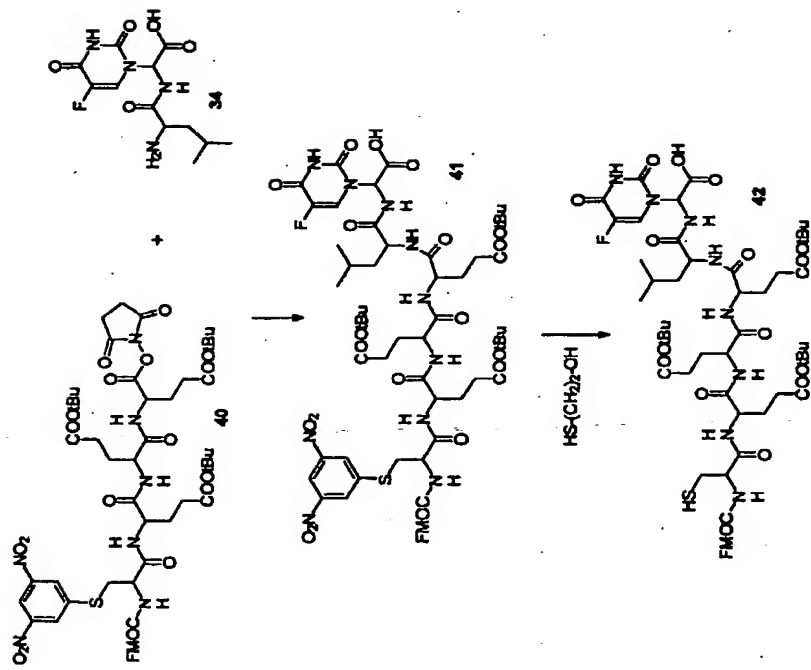
#### [0153]

4.4 薬物結合重合接合体、53の集合

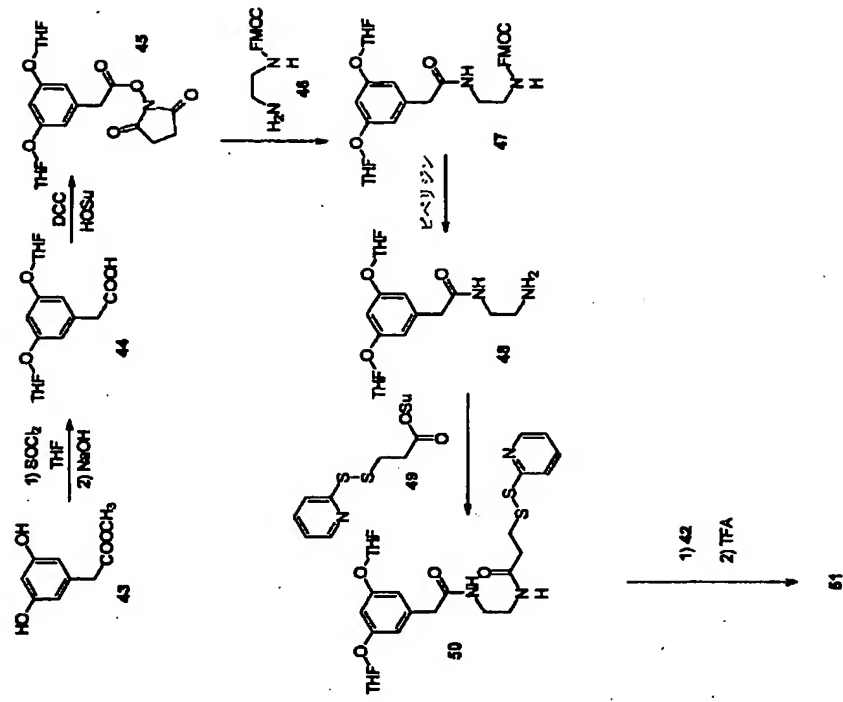
この実施例は、生物活性物質、D、がH-Leu-Gly-α (S-フルオロウラシル) -OHから誘導され、リンカーの酵素的に切断された領域、(L<sub>1</sub>-L<sub>n</sub>)、がヘプタペプチド、Cys-Glu-Glu-Glu-Leu-Glyであり、多官能性化学部分、M、が化合物51であり、水溶性重合体セグメント、P、が平均分子量が約1000(PEG-1000)のポリ(エチレングリコール)である、規則的反復鎖状重合接合体の生成法（合成経路3を参照）を記載している。

合成経路1

[化30]

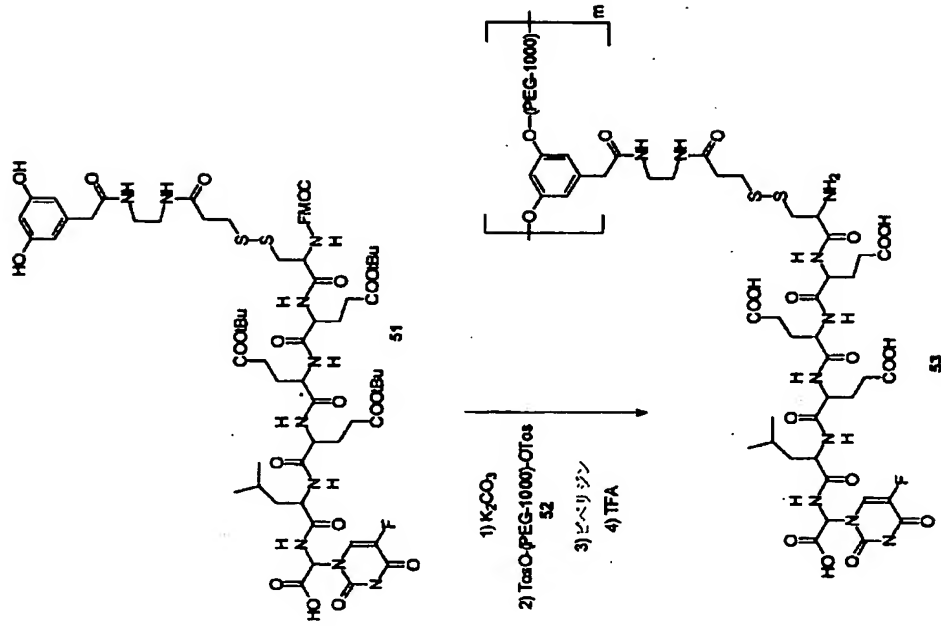


[化31]



[化32]





## 【0154】

Fmoc-L-Cys(DNP)-L-Glu(OtBu)-L-Glu(OtBu)-L-Leu-2(5-フルオロウラシル-1-イル)-L,D-Gly-OH、41の生成

磁気撹拌子、温度計およびドリエライト(Drierite)充填乾燥用チューブを備え

た清器で乾燥した250mlの丸底フラスコに、11.62g(10mmol)のFmoc-Cys(2,4-ジトロフェニル(DNP))-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-Osu、40(Bachem)、100mlの乾燥1,2-ジメトキシエタン、1.40ml(10mmol)のトリエチルアミン(Aldrich)、および3.16g(10mmol)のロイシル-2-(5-フルオロウラシル-1-イル)-L,D-グリシン、34(Putnamら、Bioconjugate Chem., 1995, 6, 483の方法によって生成した)を添加する。反応混合物を室温において1時間撹拌し、次いで400mlの水に注ぐ。十分量の0.1N HClを徐々に添加して溶液のpHをpH5にし、沈殿をろ過し、乾燥して、アセトニトリルと水の混合物の最小量に溶解する。得られる溶液をC18逆相HPLCを使用してクロマトグラフィーし(溶出液:アセトニトリル:水:0.1%トリフルオロ酢酸)、回収した溶出液を合わせて、溶媒を回転式エバポレータで留去してFmoc-L-Cys(DNP)-L-Glu(OtBu)-L-Glu(OtBu)-L-Leu-2-(5-フルオロウラシル-1-イル)-L,D-Gly-OH、41を得る。

## 【0155】

Fmoc-L-Cys-L-Glu(OtBu)-L-Glu(OtBu)-L-Glu(OtBu)-L-Leu-2-(5-フルオロウラシル-1-イル)-L,D-Gly-OH、42の生成

磁気撹拌子および温度計を備えた清器で250mlの丸底フラスコに6.82g(5mmol)のFmoc-L-Cys(DNP)-L-Glu(OtBu)-L-Glu(OtBu)-L-Glu(OtBu)-L-Leu-2-(5-フルオロウラシル-1-イル)-L,D-Gly-OH、41および50mlの2-メルカプトエタノール(Aldrich)を添加する。pHが8になるまで、1N水酸化ナトリウム液を添加し、次いで反応混合物を室温において1時間撹拌する。溶媒を回転式エバポレータで留去し、適当な溶媒を使用して蒸留残渣を結晶化して、Fmoc-L-Cys-L-Glu(OtBu)-L-Glu(OtBu)-L-Leu-2-(5-フルオロウラシル-1-イル)-L,D-Gly-OH、42を得る。

## 【0156】

3,5-(2-ジテトラヒドロフランニルオキシ)-フェニル酢酸、44の生成

磁気撹拌子、乾燥 $N_2$ 導入-流出口および温度計を備えた清器で250mlの丸底フラスコに48mlの乾燥テトラヒドロフランを添加し、次いで2.16g(16mmol)の塩化スルフルル(Aldrich)を徐々に添加する。反応混合物を室温において15分間撹拌し、同時に、0.91g(5mmol)の3,5-ジヒドロフェニル酢酸、43(Aldrich)を加えて

攪拌中の25mLのテトラヒドロフラン溶液に0.5時間かけてトリエチルアミン(3.64 g, 36mmol)のテトラヒドロフラン(5mL)溶液を添加する。反応混合物を40℃においてさらに1時間攪拌し、-16℃に冷却し、ろ過し、溶媒を回転式エバポレータでろ液から留去する。蒸留残渣に30mLのジエチルエーテルで2回混ぜ合わせ、上層を合わせて、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、溶媒を回転式エバポレータで留去する。0.8Mの水酸化ナトリウムを30mLのメタノールに溶解したものからなる5mLの溶液に蒸留残渣を溶解し、室温で15分間攪拌する。1.0N HClを添加することによって反応混合物のpHを6に調整し、次いで100mLの酢酸エチルを添加する。有機層を水層から分離し、有機層を無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥し、ろ過し、溶媒を回転式エバポレータで留去して、3,5-(2-ジテトラヒドロフランニルオキシ)-フェニル酢酸を得る。

#### [0157]

3,5-(2-ジテトラヒドロフランニルオキシ)-フェニル酢酸、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、45の生成

磁気攪拌子、温度計およびドリエライト(Drierite)充填乾燥用チューブを備えた清潔で乾燥した250mLの丸底フラスコに、3.08g(10mmol)の3,5-(2-ジテトラヒドロフランニルオキシ)-フェニル酢酸、44、200mLの1,2-ジメトキシエタン、1.15g(10mmol)のN-ヒドロキシスクシンイミド (Aldrich) および2.06gの1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド (Aldrich) を添加する。反応混合物を室温において12時間磁力的に攪拌し、ろ過し、溶媒を回転式エバポレータで留去する。適当な溶媒を使用して蒸留残渣を結晶化して、3,5-(2-ジテトラヒドロフランニルオキシ)-フェニル酢酸、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、45を得る。

#### [0158]

3,5-(2-ジテトラヒドロフランニルオキシ)-フェニル酢酸、N-(N'-フルオレニルメトキシカルボニルエタンジアンミン、47)の生成

磁気攪拌子、温度計およびドリエライト(Drierite)充填乾燥用チューブを備えた清潔で乾燥した250mLの丸底フラスコに4.05g(10mmol)の3,5-(2-ジテトラヒドロフランニルオキシ)-フェニル酢酸、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、45、100mLの乾燥1,2-ジメトキシエタン、1.40mL(10mmol)のトリエチルアミン (Ald

rich) および2.82g(10mmol)のN-フルオレニルメトキシカルボニルエタンジアンミントリフロアセテート、46(Adamczakら, Organic Preparations and Procedures International, 1995, 27, 239の手法により生成した)を添加する。反応混合物を室温において14時間攪拌し、次いで50mLの水および100mLのジクロロメタンを添加する。有機層を水層から分離し、水層を100mLのジクロロメタンで2回洗浄する。有機層を合わせて、無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥し、溶媒を回転式エバポレータで留去する。適当な溶媒を使用して蒸留残渣を結晶化して、3,5-(2-ジテトラヒドロフランニルオキシ)-フェニル酢酸、N-(N'-フルオレニルメトキシカルボニルエタンジアンミン、47)を得る。

#### [0159]

3,5-(2-ジテトラヒドロフランニルオキシ)-フェニル酢酸、N-エタンジアンミンアド、48の生成

磁気攪拌子、温度計およびドリエライト(Drierite)充填乾燥用チューブを備えた清潔で乾燥した250mLの丸底フラスコに5.72g(10mmol)の3,5-(2-ジテトラヒドロフランニルオキシ)-フェニル酢酸、N-(N'-フルオレニルメトキシカルボニルエタンジアンミン、47、および1mLのピペリジン (Aldrich) を添加する。反応混合物を室温において1.5時間磁力的に攪拌し、溶媒を回転式エバポレータで留去する。蒸留残渣に250mLのジエチルエーテルを混ぜ合わせ、得られる沈殿をろ過し、減圧下で乾燥して3,5-(2-ジテトラヒドロフランニルオキシ)-フェニル酢酸、N-エタンジアンミンアド、48を得る。

#### [0160]

ジスルフイド付加物、50の生成

磁気攪拌子、温度計およびドリエライト(Drierite)充填乾燥用チューブを備えた清潔で乾燥した250mLの丸底フラスコに3.50g(10mmol)の3,5-(2-ジテトラヒドロフランニルオキシ)-フェニル酢酸、N-エタンジアンミンアド、48、100mLの乾燥1,2-ジメトキシエタン、1.40mL(10mmol)のトリエチルアミンおよび3.12g(10mmol)のN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオネート、49(Pierce, Rockford, IL)を添加する。反応混合物を室温において14時間攪拌し、ろ過し、溶媒を回転式エバポレータで留去する。適当な溶媒を使用して蒸留残渣を結晶化して

、ジスルフィド付加物、50を得る。

#### 【0161】

ジヒドロキシフェニル-ジスルフィド付加物、51の生成

磁気攪拌子、温度計およびドライエライト(Drierite)充填乾燥用チューブを備えた清深で乾燥した250mlの丸底フラスコに、100mlのN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)、5.47g(10mmol)のジスルフィド付加物、50、および11.97gのFmoc-L-Lys-L-Glu(OtBu)-L-Glu(OtBu)-L-Glu(OtBu)-L-Leu-2-(5-フルオロラシル-L-イル)-L,D-Gly-OH、42を添加する。反応混合物を室温において20時間攪拌させ、次いで溶媒を減圧下で留去する。蒸留残渣を水：DMFの1:1混合物に溶解し、次いでトリフルオロ酢酸(TFA)を添加して、pHを5にする。反応混合物を室温において2時間攪拌し、次いで濃い炭酸ナトリウム水溶液を使用してpHをpH 7に調整する。100mlのジクロロメタンを添加し、有機層を水層から分離し、水層を100mlのジクロロメタンで2回抽出する。有機層を合わせて、無水硫酸ナトリウムで4時間乾燥し、溶媒を回転式エバポレータで留去する。適量の溶媒を使用して蒸留残渣を結晶化し、ジヒドロキシフェニル-ジスルフィド付加物、51を得る。

#### 【0162】

本発明の薬物結合重合構築物、53の生成

温度計、添加ロータ、還流器、磁気攪拌子および乾燥N<sub>2</sub>導入-流出口を備えた500mlの丸底フラスコに100mlのアセトニトリル、0.28g(2mmol)の炭酸カリウム細粉、0.25gの18-クラウン(6 (Aldrich)、10mlの水、および1.49g(1mmol)のジヒドロキシフェニル-ジスルフィド付加物、51を添加する。反応混合物を加熱還流して、次いで、2.0gのDTS-PEG1000、52(上記ジシレート、8の合成法参照)を添加する。反応混合物を加熱還流して、室温において18時間攪拌し、次いで0.1N HClを徐々に添加して反応混合物を酸性化する。溶媒を回転式エバポレータで留去し、5mlのジベリジンと25mlのN,N-ジメチルホルムアミド(DMF)に溶解したものを添加する。反応混合物を室温において1時間攪拌し、溶媒を回転式エバポレータで留去する。蒸留残渣を5mlのトリフルオロ酢酸(TFA)および30mlの水に溶解し、次いで溶媒を回転式エバポレータで留去する。蒸留残渣を25mlの水に溶解し、蒸留水で透析する(分子重量カットオフ値が12,000~14,000のメンブレン

ポア膜)。得られた溶液を凍結乾燥して本発明の薬物重合接合生成物、53を得る。53の平均分子量はGPC分析によって求め、生成構築物中の51の置換の程度はUVおよびNMR分光法を使用して算出する。

#### 【0163】

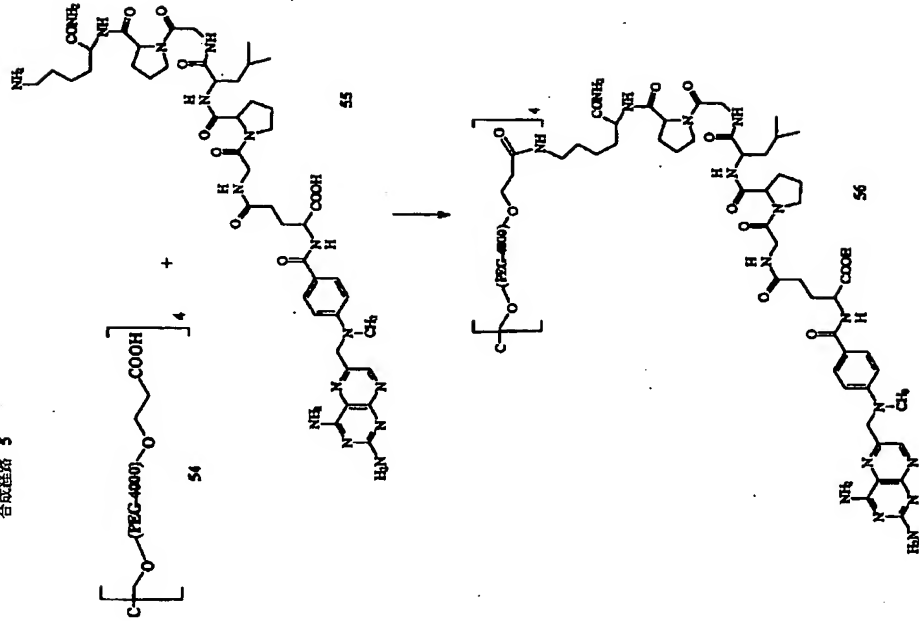
4.5 本発明の薬物結合重合接合体、56の集合

この実施例は、物質、D、がメトトレキセートから誘導され、リンカーの酵素的に切断可能な領域、(L<sub>1</sub>-L<sub>n</sub>)、がヘキサペプチド、Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-Lys-NH<sub>2</sub>、であり、共通の多官能性化学部分、Q、がペンタエリスリトールであり、かつ水性重合セグメント、P、が平均分子量が約4000のポリ(エチレングリコール)である、本発明の分岐重合薬物接合体の生成法(合成経路5を参照)を記載している。

合成経路5

#### 【化33】

合成経路 5



【0164】

発明された薬物重合構築物56の調製

磁気攪拌棒、温度計、及びドリエライト(Drierite)を充填した乾燥チューブを  
 装備した清浄な乾燥250mL丸底フラスコに、10mmolの4つのアームを持つ分枝PEG-  
 プロピオン酸ステテム54(Sharwater Polymers, Huntsville, AL)、100mLの乾燥N

,N-ジメチルホルムアミド、7.0mL(50mmol)のトリエチルアミン(Aldrich)、及び4  
 0mmolの55(Anaspec, San Jose, CA)を入れる。反応混合液を室温で10時間攪拌し  
 、続いて400mLの水冷却した水に注入する。pH4になるまで充分量の0.1NHClをゆっ  
 くりと添加し、溶媒を減圧下で除去する。得られた沈殿物を適当な溶媒から結晶  
 化することで、発明の薬物重合構築物56を得る。56の平均分子量をGPC分析によ  
 って決定し、生成構築物における55の置換の割合を、UV及びNMRスペクトル分析  
 を用いて算出する。

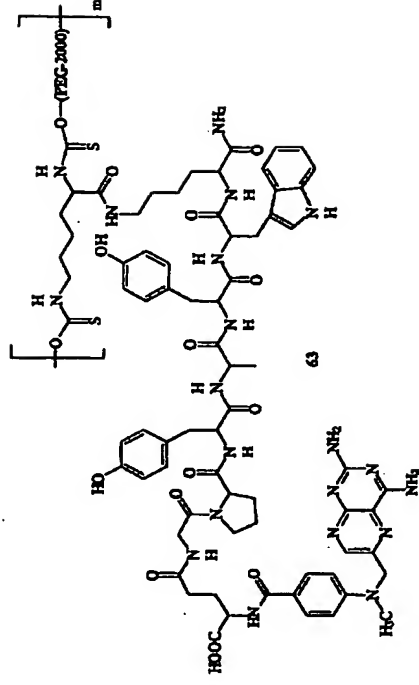
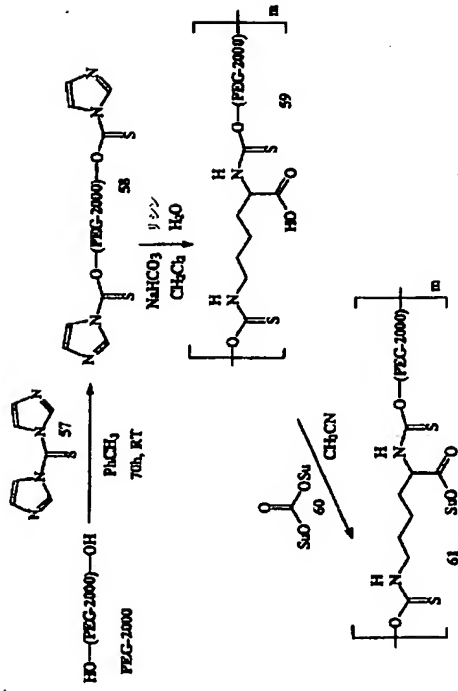
【0165】

#### 4.6 薬物が結合したポリマー接合体63の集合

本実施例(下記の合成経路6参照)は規則的に反復する本発明の線状重合薬物  
 接合体の調製について記載しており、ここでは、生物学的活性剤Dがメトトレキ  
 セートであって、また酵素的に切断されたリンカー領域(L<sub>1</sub>-L<sub>n</sub>)がヘプタペプチ  
 ド、Gly-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Lysであって、また多官能化学成分Mがリシンであ  
 って、また水溶性ポリマーセグメントPが約2000の平均分子量を持つポリ(エチ  
 レングリコール)(PEG-2000)である。

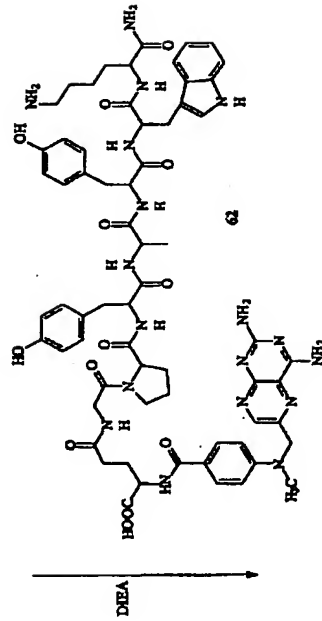
合成経路 6

【化34】



## 【0166】

ポリ (エチレングリコール) のビス (イミダズイル) チオカルバマート 58 の調製  
 磁気攪拌棒、加熱用マントル、ジーン・スターク (Dean-Stark) 水除去トラップ、コンデンサ、及びドリエライト (Drierite) を充填した乾燥チューブを装備した、  
 清浄な乾燥 250 mL 丸底フラスコに、120 mL のトルエンと 10.0 g (5 mmol) の PEG-2000 (Aldrich, Milwaukee, WI) を入れる。得られた溶液を 2 時間還流すると、その間に約 100  $\mu\text{L}$  の水がジーン・スタークトラップで集められ、その後加熱用マントルが除去される。反応混合液を周囲温度になるまで冷却し、6.0 g (33.7 mmol) の 1,1'-トリカルボニルジイミダゾール、テック (tech.), 90% (Aldrich) を一度に添加する。反応混合液を室温で 70 時間攪拌し、続いて回転式蒸発を行って溶媒の約 3/4 を除去するとオレングジ色のオイルが得られる。オイルを、迅速に攪拌しているエチルエーテル 300 mL にゆっくりと添加することによって二相の混合液が得られる。エーテル (上) 層をデカントし、下層にある粘性オイルを 300 mL の新たなエチルエーテルにゆっくりと添加する。エーテル層をもう一度デカントし、オイル状の下層を 70 mL の酢酸エチルに溶解する。酢酸エチル溶液を 300 mL の迅速に攪拌し



## 【化35】

ている冷却エチルエーテルにゆっくりと滴下することによって、灰白色の沈殿物が得られる。沈殿した固体を濾過し、5分間真空乾燥してから4時間真空に置くことによって、ポリ（エチレングリコール）のビス（イミダゾリル）トリカルバメート58、6.9g(3.1mmol、62%の収率)を、灰白色の固体として得られる。<sup>1</sup>H NMRは、脂肪族であるエチレングリコールのプロトンと、芳香族のイミダゾール置換基が関連するプロトンの両方を示している。

#### [0167]

線状コポリマー骨格59の調製

磁気翼を装備した清浄な乾燥済みの2mLの反応容器に、0.5mLの水、0.8mLの塩化メチレン、29mg(345  $\mu$ mol)の炭酸水素ナトリウム、10mg(69  $\mu$ mol)のリシン(Aldrich)、及び138mg(69  $\mu$ mol)のポリ（エチレン）グリコールのビス（イミダゾリル）チオカルバメート、58を入れる。反応混合液を室温で20時間攪拌し、塩化メチレンを回転式蒸発によって除去し、残っている水性の残渣を3×1mLの塩化メチレンを用いて洗浄する。有機層を合わせて無水硫酸マグネシウム上で乾燥し、濾過してから溶媒を減圧で除去する。抽出した残渣を3mLの脱イオン化水に溶解し、蒸留水で透析する（カットオフ分子量が3,500であるススベクトラポール膜(Spectrapor membran)。透析バッグに残っている水溶液を凍結乾燥することによって、64mgの線状コポリマー骨格59を白色固体として得ることができる。GPC(Polymer Lab PL-GEL 10<sup>5</sup> 及び10<sup>4</sup> カラム、0.1%のLiBrを入れたDMF溶離剤)は、多分散率が1.42で、分子量が19,022の産物コポリマーを示す。

#### [0168]

活性なコポリマー骨格61の調製

温度計、磁気攪拌棒、及びドリエライト(Drierite)を充填した乾燥チューブを装備した50mLの丸底フラスコに、20mLのアセトニトリル、4.74g(2.0mmol)の線状コポリマー骨格である59、1.0mLのピリジン、及び1.54g(6.0mmol)のN,N'-ジメタキシイミジルカーボネート、テック(tech.)(Aldrich)を入れる。得られた溶液を室温で17時間定期的に攪拌し、続いて急速に攪拌している300mLのエチルエーテルに滴下して添加する。エーテル混合液を0.5時間攪拌し、濾過してから集めた沈殿物を2×300mLの新しいエーテルで洗浄する。単離した固体を真空中で乾

燥することによって、活性型のコポリマー骨格61が得られる。

#### [0169]

発明された薬物が結合したポリマー構築物63の調製

磁気性回転翼を装着した5mLの反応容器に、500  $\mu$ LのN,N'-ジメチルホルムアミド、117mg(50  $\mu$ mol)の活性型コポリマー骨格61、87  $\mu$ L(500  $\mu$ mol)のN,N'-ジイソプロピルエチルアルミン(ChemImpex, Wood Dale, IL)、及び66mg(50  $\mu$ mol)のペプチド接合体62(AnaSpec, Inc., San Jose, CA)を入れる。反応混合液を室温で24時間攪拌し、続いて7mLのエチルエーテルを滴下して添加する。エーテルの上澄みを黄色の沈殿物からデカントし、残っている固体を7mLの新しいエチルエーテルで洗浄する。集めた固体を7.5mLの脱イオン化水に溶解し、pHを塩酸によって2.5に調節してから得られた溶液を蒸留水で透析する（カットオフ分子量が3,500であるススベクトラポール膜）。水溶液を凍結乾燥することによって、薬物が結合したポリマー構築物63が得られる。63の平均分子量をGPC分析によって測定するとともにチオカルバメートリンケージの存在をIRスペクトル分析によって確認し、そして62が生成構築物に置換した割合をUV及びNMRスペクトル分析を用いて算出する。

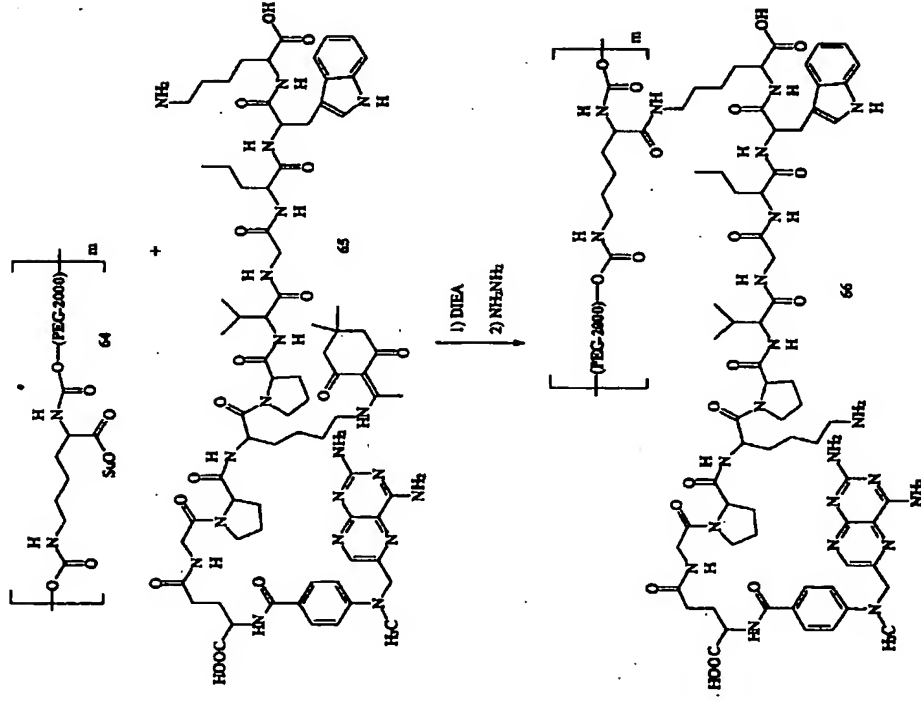
#### [0170]

4.7 薬物が結合したポリマー接合体67の集合

本実施例（下記の合成経路7参照）は規則的に反復する線状重合薬物接合体の調製について記載しており、ここでは、薬学的薬剤Dがメトトレキセートであって、また酵素的に切断されたリンカー領域(L<sub>1</sub>-L<sub>n</sub>)がペプチドGly-Pro-Lys-Pro-VaI-Gly-Nva-Trp-Lysであって、また多官能化学成分Mがリシンであって、また水溶性ポリマーセグメントPが約2000の平均分子量を持つポリ（エチレングリコール）(PEG-2000)である。

合成経路7

[化36]



[0171]

発明された薬物が結合したポリマー標薬物66の調製

磁気性回転翼を装着した5mlの反応容器に、1mlのN,N-ジメチルホルムアミド、74.8mg(32 $\mu$ mol)の活性型コポリマー骨格64 (KohnらのMacromolecules, 1992, 25, 4476の方法によって調製した)、55 $\mu$ L(320 $\mu$ mol)のN,N-ジイソプロピルエ

チルアミン(ChemImpex, Wood Dale, IL)、及び50mg(32 $\mu$ mol)のペプチド接合体65(AraSpec, Inc., San Jose, CA)を入れる。反応混合液を室温で60時間攪拌し、続いて5mlの水を添加する。水溶液を室温で24時間攪拌し、200 $\mu$ Lのヒドラジン(Aldrich)を添加し、得られた水溶液を蒸留水で透析する(カットオフ分子量が3,500であるスベクトラポール膜)。透析膜にある均質な溶液を凍結乾燥することによって、薬物が結合したポリマー標薬物66が得られる。66の平均分子量をGPC分析によって測定するとともにカルバメートリンケージの存在をIRスペクトル分析によって確認し、そして65が産物に置換した割合をUV及びNMRスペクトル分析を用いて算出する。

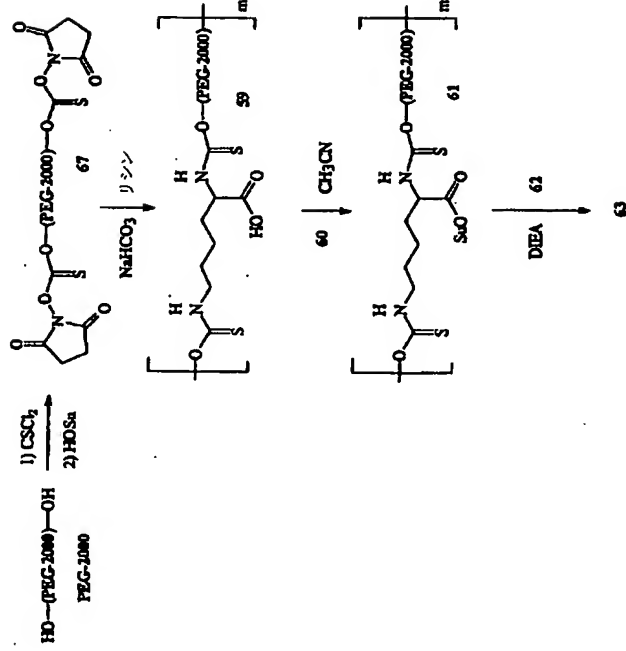
[0172]

#### 4.8 薬物が結合したポリマー接合体63の別の集合

本実施例(下記の合成経路8参照)は本発明の規則的に反復する線状重合薬物接合体の調製について記載しており、ここでは、生物学的活性剤であるDがメトトレキセートであって、また酵素的に切断されたリンカー領域(L<sub>1</sub>-L<sub>n</sub>)がヘプタペプチドGly-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Lysであって、また多官能化学成分がグリシンであって、また水溶性ポリマーセグメントPが約2000の平均分子量を持つポリ(エチレングリコール)(PEG-2000)である。

合成経路8

[化37]



## 【0173】

ポリ（エチレングリコール）のビス-サクシニイミジルチオカルバマレート67の調製

コンデンサ、窒気攪拌棒、添加用ロータ、乾燥チューブ、加熱用マントル、ジーンスターク（Dean-Stark）水除去トラップ、HClトラップを装備した清浄な乾燥250mL丸底フラスコに、10.0g(5mmol)のPEG-2000(Aldrich)と120mLのトルエンを入れる。ポリマー溶液を2時間還流して共沸乾燥し、室温に冷却してから2.2mL(29mmol)のチオホスゲン(Aldrich)を一度に添加する。反応混合液を18時間室温で攪拌し、続いて溶媒を減圧下で蒸発させる。蒸留した残渣をトルエンに残留に添加し、溶媒を再び減圧下で蒸発させる。蒸留した残渣をトルエンに；塩化メチレンの3：1混合液に溶解する。1.7g(14.8mmol)のN-ヒドロキシサクシニイミドを添加して、反応混合液を室温で1時間攪拌する。反応混合液を氷浴で冷却し、1.5g(14.9mmol)のトリエチルアミン(Aldrich)を添加する。冷却浴を取り外してから

反応混合液を室温で5時間攪拌し、続いて再び氷浴を装着し、反応混合液を濾過する。溶媒の約半分を回転式蒸発により濾液から除去し、60mLのエチルエーテルを激しく攪拌しながら添加する。得られた沈殿物を濾過し、適当な溶媒を用いて結晶化することによって、ポリ（エチレングリコール）のビス-サクシニイミジルチオカルボネート67が得られる。NMR及びIRスペクトル分析を用いることでチオカルボネートの形成の割合を同定し、定量化できる。

## 【0174】

線状反復コポリマー59の調製

オーバ-ヘッド攪拌器を装着した清浄な500mLの三首丸底フラスコに、1.1g(6.8mmol)のL-リシン(Aldrich)、2.5g(31.5mmol)の炭酸水素ナトリウム及び150mLの水を入れる。300mLの塩化メチレンに溶解した6.8mgの67からなる溶液を添加し、反応混合液を室温で2時間、激しく攪拌する。塩酸を注意深く添加することによってpHを2まで低め、有機層を水性相から分離する。有機層を2×100mLの飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水マグネシウム表面上で乾燥してから濾過し、そして溶媒を回転式エバポレータによって除去する。粗ポリマーを50mLの水に溶解してからカットオフ分子量が12,000-14,000ダルトンのSPECTRAPOR膜を用いて蒸留水で透析する。この透析膜に維持されている水溶液を透析乾燥することによって、線状反復コポリマー59を白色固体として得ることができる。GPCを用いれば産物の平均分子量を決定でき、またIRを用いればチオカルバマートリンケージの存在を確認でき、そして<sup>1</sup>H NMRスペクトル分析を用いればリシンプロトンの存在を確認できる。

## 【0175】

発明された薬物が結合したポリマー-接合体63の調製

線状反復ポリマー59を用いて発明された構築物63を調製するために用いられる二つの段階は、第4.6章で記載された段階と同じである。

## 【0176】

4.9 薬物が結合したポリマー-接合体71の集合

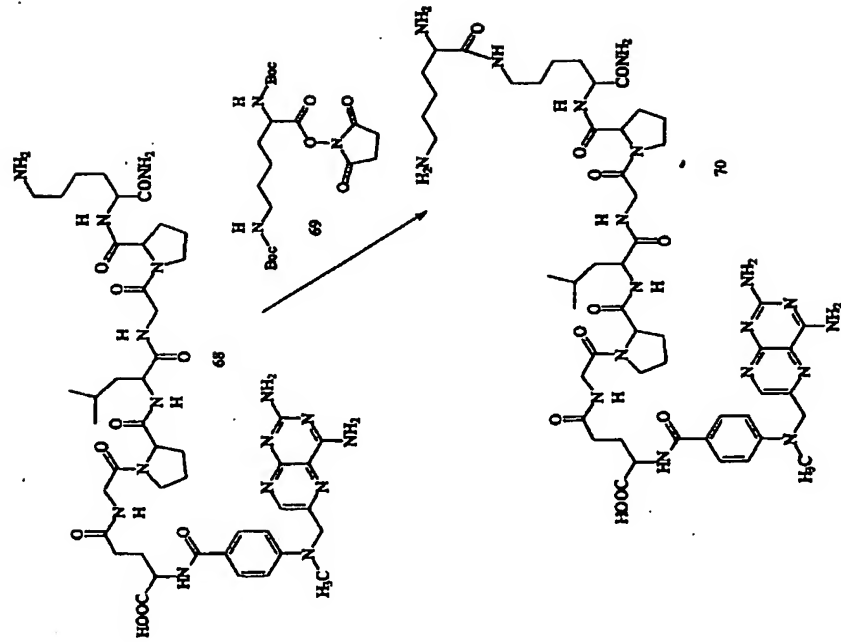
本実施例は、本発明の規則的反復線状重合薬物接合体の調製（合成経路9参照）について記載しており、薬学的物質であるDはメトトレキセートであって、ま



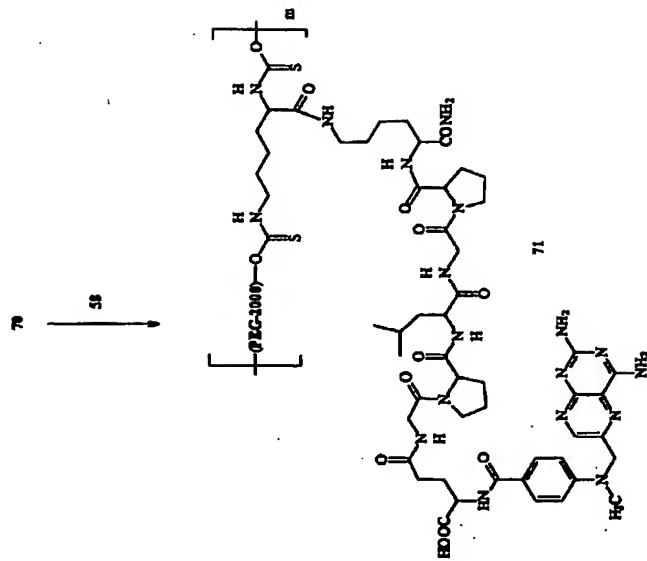
た酵素的に切断されたリンカー領域(L<sub>1</sub>-L<sub>n</sub>)がヘキサペプチドGly-Pro-Leu-Gly-P  
ro-Lysであって、また多官能化学成分M<sub>1</sub>(リシン)であって、また水溶性ポリマー  
セグメントP<sub>1</sub>が約2000の平均分子量を持つポリ(エチレングリコール)(PEG-2000  
)である。

合成経路9

[化38]



[化39]



[0177]

メトトレキセートペプチド接合体70の調製

磁気性攪拌棒と乾燥チューブを装着した50mLの清浄な乾燥反応容器に、25mLの  
N,N-ジメチルホルムアミド、1.00g(1mmol)のメトトレキセートペプチド接合体6  
8 (AnaSpec, Inc.), 1.74mL(10mmol) のN,N-ジイソプロピルエチルアルミン(Aldri  
ch)、及び0.44g(1mmol)のN<sub>α</sub>, N<sub>ε</sub>-ジ-t-Boc-L-リシン、N-ヒドロキシサクシ  
イミドエステル(Sigma, St. Louis, MO)を入れる。反応混合液を室温で18時間攪  
拌し、続いて溶媒を回転式蒸発によって除去する。蒸留した残渣を水に溶解し、  
目的の産物をアセトニトリル：水(0.1%TFA) 溶出溶液を用いて逆相C-18クロマト  
グラフィーによって単離する。溶離物画分を含む産物を合わせて凍結乾燥するこ  
とによって、メトトレキセートペプチド接合体である70が黄色の固体として得

られる。この産物の同定は、 $^1\text{H}$  NMR及びマススペクトル分析によって決定する。

#### [0178]

発明された薬物が結合したポリマー構築物71の調製

磁気性攪拌棒と乾燥チューブを装着した50mLの清浄な乾燥反応容器に、25mLのN,N-ジメチルホルムアミド、1.13g(1mmol)のメトトレキセート-ペプチド接合体70、1.74mL(10mmol)のN,N-ジイソプロピルエチルアルミン(Aldrich)、及び2.22g(1mmol)のポリ(エチレングリコール)のビス(イミダゾリル)チオカルバメート58を入れる。反応混合液を室温で18時間攪拌し、続いて溶媒を回転式蒸発によって除去する。蒸留した残渣を水に溶解し、得られた溶液を蒸留水に対して(カットオフ分子量が10,000であるスベクトラポール膜で)透析して、発明された薬物が結合したポリマー構築物71が、黄色の固体として得られる。構築物の平均分子量をGPCによって測定し、チオカルバメートリンケンagesの存在はIRスペクトル分析によって確認し、また生成構築物への70の置換の割合はUV及びNMRスペクトル分析を用いて算出する。

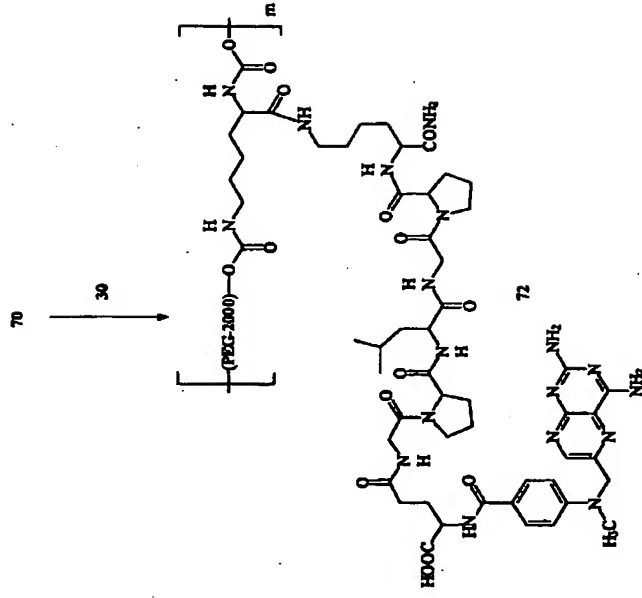
#### [0179]

4.10 薬物が結合したポリマー接合体72の集合

本実施例は、本発明の規則的反復縮重合薬物接合体の調製(合成経路10参照)について記載しており、薬学的物質であるDはメトトレキセートであって、また酵素的に切断されたリンカー領域( $L_1-L_n$ )がヘキサペプチドGly-Pro-Leu-Gly-Pro-Lysであって、また多官能化学成分Mがトリシンであって、また水溶性ポリマーセグメントPが約2000の平均分子量を持つポリ(エチレングリコール)(PEG-2000)である。

合成経路10

#### [化40]



#### [0180]

発明された薬物が結合したポリマー構築物72の調製

磁気性攪拌棒と乾燥チューブを装着した50mLの清浄な乾燥反応容器に、25mLのN,N-ジメチルホルムアミド、1.13g(1mmol)のメトトレキセート-ペプチド接合体70、1.74mL(10mmol)のN,N-ジイソプロピルエチルアルミン(Aldrich)、及び平均分子量2000のポリ(エチレングリコール)のビスサクシニミジミルカーボネート30、2.28g(1mmol)を入れる。反応混合液を室温で18時間攪拌し、続いて溶媒を回転式蒸発によって除去する。蒸留した残渣を水に溶解し、pHを濃HClを用いて2.5に調節してから得られた溶液を蒸留水に対して(カットオフ分子量が10,000であるスベクトラポール膜で)透析して、発明された薬物が結合したポリマー構築物72が、黄色の固体として得られる。この構築物の平均分子量をGPCによって測定し、チオカルバメートリンケンagesの存在はIRスペクトル分析によって確認し、また

産物への70の置換の割合をUV及びNMRスペクトル分析を用いて算出する。

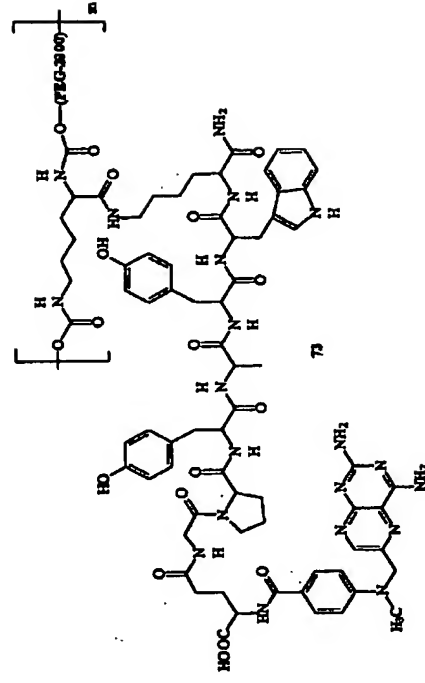
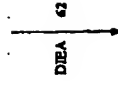
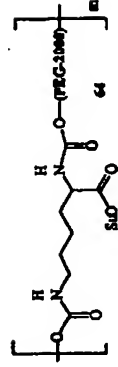
#### 【0181】

#### 4.11 薬物が結合したポリマー接合体66の集合

本実施例は、本発明の規則的反复線状重合薬物接合体の調製（合成経路11参照）について記載しており、薬学的物質であるDはメトトレキセートであって、また酵素的に切断されたリンカー領域(L<sub>1</sub>-L<sub>n</sub>)がヘプタペプチドGly-Pro-Tyr-Ala-Tyr-Trp-Lysであって、また多官能化学成分Mがリシンであって、また水溶性ポリマーセグメントPが約2000の平均分子量を持つポリ（エチレングリコール）（PEG-2000）である。

#### 合成経路11

#### 【化41】



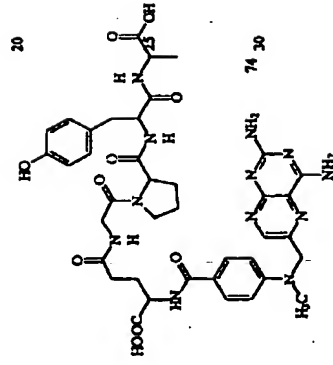
#### 【0182】

発明された薬物が結合したポリマー構薬物73の調製

磁気性回転翼を装着した5mLの反応容器に、0.5mLのN,N-ジメチルホルムアミド、117mg (30 μmol)の活性化コポリマー骨格64 (KohnらのMacromolecules, 1992, 25, 4476の方法によって調製した)、87 μL (10等量) のN,N-ジイソプロピルエチルアミン (ChemImpex)、及び50mg (30 μmol)のペプチド接合体62 (AnaSpec)を入れる。反応混合液を室温で24時間攪拌し、続いて7mLのエチルエーテルを滴下して添加することによって黄色の沈殿物が得られる。液体を沈殿物からデカントし、固体を7mLの新しいエチルエーテルで洗浄する。上澄みを再びデカントしてから

固体残渣を減圧して乾燥し、7.5mLの脱イオン水を添加する。得られた水溶液を脱イオン水で透析し（カットオフ分子量が3,500ダルトンであるススベクトラポール膜）、続いて凍結乾燥することによって95mg(28.5mmol、57%の収率)の発明された薬物が結合した標薬物73が黄色の固体として得られる。GPC（溶媒剤として0.1M LiBrを含むDMFを用いたPolymer Lab PL-GEL 10,000及び100,000カラム）は、ポリマー-薬物標薬物の平均分子量が73,072であって、4.17の多分散率を伴うことを示す。62がPEG-リシン骨格に導入される含有量は、UVスペクトル分析によって39%であると測定される。MMP3標薬素（Chemicon International, Temecula, CA）を用いて73を処理すると、結果的にメトトレキセート-ペプチド断片74が形成される。73から74への開裂率は、RP-18 HPLCによって、37°Cにおいて2時間で33%であると決定される。

[化42]



[0183]

U973細胞を用いる細胞毒性の研究は、ポリマー標薬物73が対照（100%として設計されている）の増殖と同等に細胞増殖できることを示した。メトトレキセート-ペプチド断片74の試料とメトトレキセート単独の試料は、それぞれ10%及び6%の細胞増殖が可能であった。

[0184]

本明細書で記載された全ての刊行物、特許、及び特許文献は、その全体が参照として本明細書内に組み入れられる。

[0185]

本発明は、前述した特定の、また好適な選抜及び方法を参照して記載されている。しかしながら本発明の精神及び意図の範囲内で、多くの改変が行われうるものと理解されるべきである。したがって、前述した実施例は限定的ではなく、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ制限されることが意図される。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		IPC/US 00/11670
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Refer to column No.
Y	RICHTOR M. ET AL: "Polymeric prodrugs of 5-Fluorouracil. JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, (1997) 48/2-3 (1997-178), figures 1-3	1-89
E	WO 00 40203 A (WANG HAI FANG ;LIAO JUN (US); MILSTEIN SAM J (US); SMART JOHN E (U) 13 July 2000 (2000-07-13) claims	1
K	WO 92 16555 A (ENZON INC) 1 October 1992 (1992-10-01) claims	1-20
Y	BRINKLEY M: "A BRIEF SURVEY OF METHODS FOR PREPARING PROTEIN CONJUGATES WITH DYES, HAPTENS, AND CROSS-LINKING REAGENTS" BIOCONJUGATE CHEMISTRY US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, vol. 3, no. 1, 1992, pages 2-13, ISSN: 1043-1802 XP000261480 tables 1,11	1-89
Y	WO 98 19705 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 14 May 1998 (1998-05-14) claims	1-89
A	EP 0 838 224 A (KURABAY CO) 29 April 1998 (1998-04-29) claims	1-89
A	EP 0 712 635 A (KURABAY CO) 22 May 1996 (1996-05-22) claims 1-3	

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		IPC/US 00/11670
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		Refer to column No.
Y	DATABASE MEDLINE 'Online' US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US: CALICET P ET AL: "Preparation and properties of monomethoxy poly(ethylene glycol) doxorubicin conjugates linked by an amino acid or a peptide as spacer." retrieved from STN XP002156126 Database accession no. 94000214 abstract 8 FARMACO, (1993 JUL) 48 (7) 919-32, -/-	1-89

1. CLASSIFICATION SUBJECT MATTER  
IPC 7 A61K47/48

2. SUMMARY OF THE INVENTION  
According to the prior art, the present invention relates to a conjugate of a drug and a polymer, the drug being a cytotoxic agent, the polymer being a poly(ethylene glycol) derivative, the conjugate being characterized in that the drug is covalently bonded to the polymer through an amino acid or a peptide as a spacer.

3. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS  
FIG. 1: Schematic representation of the conjugate of a drug and a polymer, the drug being a cytotoxic agent, the polymer being a poly(ethylene glycol) derivative, the conjugate being characterized in that the drug is covalently bonded to the polymer through an amino acid or a peptide as a spacer.

4. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION  
The present invention relates to a conjugate of a drug and a polymer, the drug being a cytotoxic agent, the polymer being a poly(ethylene glycol) derivative, the conjugate being characterized in that the drug is covalently bonded to the polymer through an amino acid or a peptide as a spacer.

5. INDUSTRIAL APPLICABILITY  
The conjugate of a drug and a polymer, the drug being a cytotoxic agent, the polymer being a poly(ethylene glycol) derivative, the conjugate being characterized in that the drug is covalently bonded to the polymer through an amino acid or a peptide as a spacer, is particularly suitable for the preparation of pharmaceutical compositions for the treatment of cancer.

1. SUMMARY OF THE INVENTION  
The present invention relates to a conjugate of a drug and a polymer, the drug being a cytotoxic agent, the polymer being a poly(ethylene glycol) derivative, the conjugate being characterized in that the drug is covalently bonded to the polymer through an amino acid or a peptide as a spacer.

2. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS  
FIG. 1: Schematic representation of the conjugate of a drug and a polymer, the drug being a cytotoxic agent, the polymer being a poly(ethylene glycol) derivative, the conjugate being characterized in that the drug is covalently bonded to the polymer through an amino acid or a peptide as a spacer.

3. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION  
The present invention relates to a conjugate of a drug and a polymer, the drug being a cytotoxic agent, the polymer being a poly(ethylene glycol) derivative, the conjugate being characterized in that the drug is covalently bonded to the polymer through an amino acid or a peptide as a spacer.

4. INDUSTRIAL APPLICABILITY  
The conjugate of a drug and a polymer, the drug being a cytotoxic agent, the polymer being a poly(ethylene glycol) derivative, the conjugate being characterized in that the drug is covalently bonded to the polymer through an amino acid or a peptide as a spacer, is particularly suitable for the preparation of pharmaceutical compositions for the treatment of cancer.

International Application No. PCT/US 00/11670

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCTISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Present claims 1-89 relate to an extremely large number of possible compounds and methods. In fact, the claims contain so many options that a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and/or concise), namely those compounds and methods recited in the examples and closely related homologous compounds.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date	State of Applicant's file
WO 00/02003 A		13-07-2000	AU 3581300 A	24-07-2000	PCT/US 00/11670
WO 9216555 A	A	01-10-1992	AU 1676992 A	21-10-1992	
			CA 2101918 A	19-09-1992	
			EP 0576589 A	05-01-1994	
WO 9819705 A		14-05-1998	EP 0941120 A	15-05-1999	
EP 0838224 A	A	29-04-1998	JP 10155892 A	16-06-1998	
			US 5980883 A	09-11-1999	
EP 0712635 A	A	22-05-1996	WO 9831223 A	23-11-1995	
			JP 8024325 A	30-01-1996	
			JP 2000070356 A	07-03-2000	
			US 5658592 A	19-08-1997	
			US 5770229 A	23-06-1998	

フロントページの続き

(51)Int. Cl.	識別記号	FI	ターム (参考)
A61P	13/02	A61P	13/02
	17/02		17/02
	19/00		19/00
	21/00		21/00
	25/00		25/00
	29/00		29/00
	35/00		35/00
	37/00		37/00

(8)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, K E, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW ), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, C N, CR, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, K Z, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, S K, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(7)発明者 ラマニ サラン

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 プ  
リンストン メイン ストリート 136  
スート 101

Fターム(参考) 4C076 B801 B811 8821 CC42 EE59